

Verfahren zum Identifizieren von fungizid wirksamen Verbindungen basierend auf
Mevalonat Kinasen aus Pilzen

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Identifizieren von Fungiziden, die Verwendung von Mevalonate Kinase zum Identifizieren von Fungiziden, und die Verwendung von Inhibitoren der Mevalonate Kinase als Fungizide.

Unerwünschtes Pilzwachstum, das in der Landwirtschaft jedes Jahr zu beträchtlichen Schäden führt, kann durch die Verwendung von Fungiziden kontrolliert werden. Die Ansprüche an Fungizide sind dabei hinsichtlich ihrer Wirksamkeit, Kosten und vor allem ihrer Umweltverträglichkeit stetig angestiegen. Es existiert deshalb ein Bedarf an neuen Substanzen bzw. Substanzklassen, die zu leistungsfähigen und umweltverträglichen neuen Fungiziden entwickelt werden können. Im Allgemeinen ist es üblich, in Gewächshaustests nach solchen neuen Leitstrukturen zu suchen. Solche Tests sind jedoch arbeitsintensiv und teuer. Die Anzahl der Substanzen, die im Gewächshaus getestet werden können, ist entsprechend begrenzt. Eine Alternative zu solchen Tests ist die Verwendung von sogenannten Hochdurchsatzverfahren (HTS = high throughput screening). Dabei werden in einem automatisierten Verfahren eine große Anzahl von Einzelsubstanzen hinsichtlich ihrer Wirkung auf Zellen, individuelle Genprodukte oder Gene getestet. Wird für bestimmte Substanzen eine Wirkung nachgewiesen, so können diese in herkömmlichen Screeningverfahren untersucht und gegebenenfalls weiter entwickelt werden.

Vorteilhafte neue Angriffspunkte für Fungizide, die dann in den genannten HTS-Verfahren genutzt werden können, werden oft in essentiellen Biosynthesewegen gesucht. Ideale Fungizide sind weiterhin solche Stoffe, die Genprodukte hemmen, die eine entscheidende Bedeutung bei der Ausprägung der Pathogenität eines Pilzes haben.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es deshalb, einen geeigneten neuen Angriffspunkt für potentielle fungizide Wirkstoffe zu identifizieren und zugänglich zu machen, und darauf basierend ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, das die Identifizierung von Modulatoren dieses Angriffspunkts vorzugsweise in einem Hochdurchsatzverfahren ermöglicht, um damit die Identifizierung neuer Fungizide zu ermöglichen.

Abbildungen und Sequenzprotokoll

- Abbildung 1: Schematische Darstellung der von der Mevalonat Kinase katalysierten Reaktion. Die Mevalonat Kinase katalysiert die Reaktion von (R)-Mevalonat und Adenosintriphosphat zu (R)-5-Phosphomevalonat und Adenosindiphosphat.
- 5 Abbildung 2: Homologie zwischen Mevalonat Kinasen aus verschiedenen Pilzen. (1) *Saccharomyces cerevisiae*, (2) *Schizosaccharomyces pombe*, (3) *Ustilago maydis*, (4) *Neurospora crassa*, (5) *Magnaporthe grisea*. Rahmen geben Bereiche mit einer genau übereinstimmenden Sequenz wieder (Konsensussequenz).
- 10 Abbildung 3: SDS-Gel zur Darstellung des Verlaufs der heterologen Expression der Mevalonat Kinase in *E. coli* BL21 (DE3). Das überexprimierte GST-Fusionsprotein hat eine Größe von 74,5 kDa. In den Spuren M wurden Größenstandards aufgetragen. Spur 1: Pelletfraktion; Spur 2: Cytoplasmafraktion der überexprimierten Mevalonat Kinase (3 Stunden nach Induktion mit 100mM IPTG bei 30°C); Spur 3: Waschfraktion nach dem Auftragen der Cytoplasmafraktion auf die Glutathion-Sepharose Säule; Spur 4: Elutionsfraktion mit angereinigter Mevalonat Kinase.
- 15 Abbildung 4: Kinetik der Umsetzung von Mevalonat und Adenosintriphosphat bei unterschiedlichen Konzentrationen der Mevalonat Kinase im Assay. In einem Assayvolumen von 50 µl wurden 300 µM Adenosintriphosphat, 500 µM Mevalonat, 300 µM NADH, 400µM Phosphoenolpyruvat, 0,2 U Pyruvat Kinase und 0,4 U Laktat Dehydrogenase sowie unterschiedliche Mengen an Mevalonat Kinase eingesetzt. Die verwendeten Proteinkonzentrationen der Mevalonat Kinase sind der Abbildung zu entnehmen. Die Umsetzung des Mevalonat wurde anhand der gekoppelten Reaktion mit Pyruvat Kinase und Laktat Dehydrogenase verfolgt. Dabei wird die Umsetzung des ATP mittels Mevalonat durch die gekoppelte Absorptionsabnahme bei 340 nm (Abnahme des NADH in gekoppelter Reaktion) verfolgt.
- 20
- 25
- SEQ ID NO:1 Nukleinsäuresequenz kodierend für die Mevalonat Kinase aus *Ustilago maydis*. Die angegebene Sequenz entspricht der genomischen DNA.
- 30 SEQ ID NO: 2 Aminosäuresequenz der Mevalonat Kinase aus *Ustilago maydis*.

Definitionen

Unter dem Begriff "Homologie" bzw. "Identität" soll die Anzahl der übereinstimmenden Aminosäuren (Identität) mit anderen Proteinen, ausgedrückt in Prozent verstanden werden. Bevorzugt wird die Identität durch Vergleiche einer gegebenen Sequenz zu anderen Proteinen mit Hilfe von Computerprogrammen ermittelt. Weisen Sequenzen, die miteinander verglichen werden, unterschiedliche Längen auf, ist die Identität so zu ermitteln, dass die Anzahl an Aminosäuren, welche die kürzere Sequenz mit der längeren Sequenz gemeinsam hat, den prozentualen Anteil der Identität bestimmt. Die Identität kann standardmäßig mittels bekannten und der Öffentlichkeit zur Verfügung stehenden Computerprogrammen wie z.B. ClustalW (Thompson et al., *Nucleic Acids Research* 22 (1994), 4673-4680) ermittelt werden. ClustalW wird z.B. öffentlich zur Verfügung gestellt von Julie Thompson (Thompson@EMBL-Heidelberg.DE) und Toby Gibson (Gibson@EMBL-Heidelberg.DE), European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, D 69117 Heidelberg, Germany. ClustalW kann ebenfalls von verschiedenen Internetseiten, u.a. beim IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, B.P.163, 67404 Illkirch Cedex, France; <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/>) und beim EBI (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/>) sowie bei allen gespiegelten Internetseiten des EBI (European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK), heruntergeladen werden. Wenn das ClustalW Computerprogramm der Version 1.8 benutzt wird, um die Identität zwischen z.B. einem gegebenen Referenzprotein und anderen Proteinen zu bestimmen, sind folgende Parameter einzustellen: KTUPLE=1, TOPDIAG=5, WINDOW=5, PAIRGAP=3, GAOPEN=10, GAPEXTEND=0.05, GAPDIST=8, MAXDIV=40, MATRIX=GONNET, ENDGAPS(OFF), NOPGAP, NOHGAP. Eine Möglichkeit zum Auffinden von ähnlichen Sequenzen ist die Durchführung von Sequenzdatenbankrecherchen. Hierbei wird eine oder werden mehrere Sequenzen als sogenannte Abfrage ("query") vorgegeben. Diese Abfragesequenz wird dann mittels statistischen Computerprogrammen mit Sequenzen, die in den ausgewählten Datenbanken enthalten sind, verglichen. Solche Datenbankabfragen ("blast searches") sind dem Fachmann bekannt und können bei verschiedenen Anbietern durchgeführt werden. Wird eine solche Datenbankabfrage z.B. beim NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt, so sollen die Standardeinstellungen, die für die jeweilige Vergleichsanfrage vorgegeben sind, benutzt werden. Für Proteinsequenzvergleiche ("blastp") sind dies folgende Einstellungen: Limit entrez = nicht aktiviert; Filter = low complexity aktiviert; Expect value = 10; word size = 3; Matrix = BLOSUM62; Gap costs: Existence = 11; Extension = 1. Als Ergebnis einer solchen Abfrage werden neben anderen Parametern auch der Anteil an Identität zwischen der Abfragesequenz und den in den Datenbanken aufgefundenen ähnlichen Sequenzen dargestellt. Unter einem erfindungsgemäßen Protein sollen daher im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung solche Proteine verstanden werden, die bei der Verwendung mindestens einer der vorstehend beschrie-

benen Methoden zur Identitätsbestimmung eine Identität von mindestens 50 % aufweisen, bevorzugt von mindestens 60 %, besonders bevorzugt von mindestens 70 %, weiter bevorzugt von mindestens 80 %, und insbesondere von mindestens 90 %.

Der Ausdruck "vollständige Mevalonat Kinase" wie er hierin verwendet wird, beschreibt eine
5 Mevalonat Kinase, die von einer vollständigen kodierenden Region einer Transkriptionseinheit kodiert wird, umfassend das ATG-Startcodon und alle informationstragenden Exonbereiche des im Herkunftsorganismus vorliegenden, für Mevalonat Kinase kodierenden Gens, sowie die für eine korrekte Termination der Transkription nötigen Signale.

Der Ausdruck "enzymatische Aktivität einer Mevalonat Kinase" wie er hierin verwendet wird,
10 bezieht sich auf die Fähigkeit eines Polypeptids, die vorstehend beschriebene Reaktion, d.h. die Umsetzung von Mevalonat und Adenosintriphosphat zu Phosphomevalonat und Adenosindiphosphat zu katalysieren. Die beschriebene Reaktion stellt dabei die vorrangig vom Polypeptid katalysierte Reaktion dar. Polypeptide, die die beschriebene Reaktion nur unter bestimmten, nicht natürlichen Bedingungen katalysieren können, oder dazu im Vergleich zur vorrangig von ihnen
15 katalysierten Reaktion nur in sehr geringem Ausmaß in der Lage sind, werden nicht umfasst.

Der Ausdruck "aktives Fragment" wie er hierin verwendet wird, beschreibt nicht mehr vollständige Nukleinsäuren kodierend für Mevalonat Kinase, die aber noch für Polypeptide mit der enzymatischen Aktivität einer Mevalonat Kinase kodieren, und die eine für die Mevalonat Kinase charakteristische Reaktion wie vorne beschrieben katalysieren können. Solche Fragmente sind kürzer als
20 die oben beschriebenen vollständigen, für die Mevalonat Kinase kodierenden Nukleinsäuren. Dabei können sowohl an den 3'- und/oder 5'-Enden der Sequenz Nukleinsäuren entfernt worden sein, es können aber auch Teile der Sequenz deletiert, d.h. entfernt worden sein, die die biologische Aktivität der Mevalonat Kinase nicht entscheidend beeinträchtigen. Eine geringere oder gegebenenfalls auch eine erhöhte Aktivität, die aber noch die Charakterisierung bzw. Verwendung
25 des resultierenden Mevalonat Kinase Fragments gestattet, wird dabei als ausreichend im Sinne des hier verwendeten Ausdrucks verstanden. Der Ausdruck "aktives Fragment" kann sich ebenso auf die Aminosäuresequenz der Mevalonat Kinase beziehen und gilt dann analog den obigen Ausführungen für solche Polypeptide, die im Vergleich zur oben definierten vollständigen Sequenz bestimmte Teile nicht mehr enthalten, wobei die enzymatische Aktivität des Enzyms jedoch nicht
30 entscheidend beeinträchtigt ist. Die Fragmente können dabei verschiedene Längen besitzen.

Der Begriff "Mevalonat Kinase Hemmtest" oder "Hemmtest", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf ein Verfahren bzw. einen Test, der es gestattet, die Inhibition der enzymatischen Aktivität eines Polypeptids mit der enzymatischen Aktivität einer Mevalonat Kinase durch eine oder mehrere chemische Verbindungen (Kandidatenverbindung(en)) zu erkennen, wodurch die

chemische Verbindung als Inhibitor der Mevalonat Kinase bzw. als Fungizid identifiziert werden kann.

Der Ausdruck "Gen", wie er hierin verwendet wird, ist die Bezeichnung für einen Abschnitt aus dem Genom einer Zelle, der für die Synthese einer Polypeptid-Kette verantwortlich ist.

- 5 Der Ausdruck "Fungizid" bzw. "fungizid" wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf chemische Verbindungen, die zur Bekämpfung von Pilzen, insbesondere von pflanzenpathogenen Pilzen geeignet sind. Solche pflanzenpathogene Pilze werden nachfolgend genannt, wobei die Aufzählung nicht abschließend ist:

- 10 Plasmodiophoromycetes, Oomycetes, Chytridiomycetes, Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes und Deuteromycetes, z.B.

- Pythium-Arten, wie beispielsweise *Pythium ultimum*, Phytophthora-Arten, wie beispielsweise *Phytophthora infestans*, Pseudoperonospora-Arten, wie beispielsweise *Pseudoperonospora humuli* oder *Pseudoperonospora cubensis*, Plasmopara-Arten, wie beispielsweise *Plasmopara viticola*, Bremia-Arten, wie beispielsweise *Bremia lactucae*, Peronospora-Arten, wie beispielsweise *Peronospora pisi* oder *P. brassicae*, Erysiphe-Arten, wie beispielsweise *Erysiphe graminis*, Sphaerotheca-Arten, wie beispielsweise *Sphaerotheca fuliginea*, Podosphaera-Arten, wie beispielsweise *Podosphaera leucotricha*, Venturia-Arten, wie beispielsweise *Venturia inaequalis*, Pyrenophora-Arten, wie beispielsweise *Pyrenophora teres* oder *P. graminea* (Konidienform: Drechslera, Syn: Helminthosporium), Cochliobolus-Arten, wie beispielsweise *Cochliobolus sativus* (Konidienform: Drechslera, Syn: Helminthosporium), Uromyces-Arten, wie beispielsweise *Uromyces appendiculatus*, Puccinia-Arten, wie beispielsweise *Puccinia recondita*, Sclerotinia-Arten, wie beispielsweise *Sclerotinia sclerotiorum*, Tilletia-Arten, wie beispielsweise *Tilletia caries*, Ustilago-Arten, wie beispielsweise *Ustilago nuda* oder *Ustilago avenae*, Pellicularia-Arten, wie beispielsweise *Pellicularia sasakii*, Pyricularia-Arten, wie beispielsweise *Pyricularia oryzae*, Fusarium-Arten, wie beispielsweise *Fusarium culmorum*, Botrytis-Arten, Septoria-Arten, wie beispielsweise *Septoria nodorum*, Leptosphaeria-Arten, wie beispielsweise *Leptosphaeria nodorum*, Cercospora-Arten, wie beispielsweise *Cercospora canescens*, Alternaria-Arten, wie beispielsweise *Alternaria brassicae* oder Pseudocercospora-Arten, wie beispielsweise *Pseudocercospora herpotrichoides*.

- 30 Von besonderem Interesse sind z.B. auch *Magnaporthe grisea*, *Cochliobolus heterostrophus*, *Nectria hematococcus* und *Phytophthora species*.

Fungizide Wirkstoffe, die mit Hilfe der erfindungsgemäßen Mevalonat Kinase gefunden werden, können aber auch mit Mevalonat Kinasen aus humanpathogenen Pilzspezies interagieren, wobei

die Interaktion mit den unterschiedlichen in diesen Pilzen vorkommenden Mevalonat Kinasen nicht immer gleich stark sein muss.

Gegenstand der vorliegenden Erfindungen ist deshalb auch ein Verfahren zum Identifizieren von Antimykotika, d.h. von Inhibitoren der Mevalonat Kinase aus human- oder tierpathogenen Pilzen, die zum Herstellen von Mitteln zur Behandlung von durch human- oder tierpathogene Pilze hervorgerufenen Erkrankungen verwendet werden können.

Dabei sind die folgenden humanpathogenen Pilze von besonderem Interesse, die unter anderem die nachfolgend genannten Krankheitsbilder hervorrufen können:

Dermatophyten, wie z.B. *Trichophyton spec.*, *Microsporum spec.*, *Epidermophyton floccosum* oder *Keratomyces ajelloi*, die z.B. Fußmykosen (Tinea pedis) hervorrufen,

Hefen, wie z.B. *Candida albicans*, die Soor-Ösophagitis und Dermatitis hervorruft, *Candida glabrata*, *Candida krusei* oder *Cryptococcus neoformans*, die z.B. pulmonale Cryptococcose und auch Torulose hervorrufen können,

Schimmelpilze, wie z.B. *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, die z.B. bronchopulmonale Aspergillose oder Pilzsepsis hervorrufen, *Mucor spec.*, *Absidia spec.*, oder *Rhizopus spec.*, die z.B. Zygomysen (intravasale Mykosen) hervorrufen, *Rhinosporidium seeberi*, der z.B. chronische granulomatöse Pharyngitis und Tracheitis hervorruft, *Mucor mycetomatis*, der z.B. subkutane Mycetome hervorruft, *Histoplasma capsulatum*, der z.B. retikuloendotheliale Zytomykose und M. Darling hervorruft, *Coccidioides immitis*, der z. B. pulmonale Coccidioidomykose und Sepsis hervorruft, *Paracoccidioides brasiliensis*, der z.B. brasilianische Blastomykose hervorruft, *Blastomyces dermatitidis*, der z.B. Gilchrist-Krankheit und nordamerikanische Blastomykose hervorruft, *Loboa lobo*, der z.B. Keloid-Blastomykose und Lobo's Krankheit hervorruft, und *Sporothrix schenckii*, der z.B. Sporotrichose (granulomatöse Hautnykose) hervorruft.

Im Folgenden sollen die Begriffe "fungizid" bzw. "Fungizid" gleichermaßen für die Begriffe "antimykotisch" bzw. "Antimykotikum" als auch für die Begriffe "fungizid" bzw. "Fungizid" im herkömmlichen Sinne, d.h. bezogen auf pflanzenpathogene Pilze, verwendet werden.

Fungizide Wirkstoffe, die mit Hilfe einer aus einem bestimmten Pilz, hier z.B. aus *U. maydis*, gewonnenen Mevalonat Kinase gefunden werden, können also auch mit einer Mevalonat Kinase aus zahlreichen anderen Pilzspezies, gerade auch mit weiteren pflanzenpathogenen Pilzen interagieren, wobei die Interaktion mit den unterschiedlichen in diesen Pilzen vorkommenden Mevalonat Kinasen nicht immer gleich stark sein muss. Dies erklärt unter anderem die beobachtete Selektivität der an diesem Enzym wirksamen Substanzen.

Der Ausdruck "Kompetitor" wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf die Eigenschaft der Verbindungen, mit anderen, gegebenenfalls zu identifizierenden Verbindungen um die Bindung an der Mevalonat Kinase zu kompetitieren und diese vom Enzym zu verdrängen bzw. von dieser verdrängt zu werden.

- 5 Der Ausdruck "Agonist", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf ein Molekül, das die Aktivität der Mevalonat Kinase beschleunigt oder verstärkt.

Der Ausdruck "Antagonist", oder auch "Inhibitor" wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf ein Molekül, das die Aktivität der Mevalonat Kinase verlangsamt oder verhindert.

- Der Ausdruck "Modulator", wie er hierin verwendet wird, stellt den Oberbegriff zu Agonist bzw. Antagonist dar. Modulatoren können kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder Antikörper sein, die an die erfindungsgemäßen Polypeptide binden bzw. die deren Aktivität beeinflussen. Weiterhin können Modulatoren kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder Antikörper sein, die an ein Molekül binden, welches wiederum an die erfindungsgemäßen Polypeptide bindet, und dadurch deren biologische Aktivität beeinflusst. Modulatoren können natürliche Substrate und Liganden darstellen oder strukturelle oder funktionelle Mimetika davon. Bevorzugt handelt es sich beim Ausdruck "Modulator", wie er hierin verwendet wird, jedoch um solche Moleküle, die nicht die natürlichen Substrate bzw. Liganden darstellen.
- 10
- 15

Beschreibung der Erfindung

Die Mevalonat Kinase (EC 2.7.1.36), im Folgenden auch mit MK abgekürzt, katalysiert die Reaktion von Mevalonat und Adenosintriphosphat zu Phosphomevalonat und Adenosindiphosphat (Abbildung 1).

- 5 Die von der Mevalonat Kinase katalysierte Reaktion ist ein essentieller Schritt am Anfang der Biosynthese von Ergosterol, Dolichol oder Ubichinon (Lees et al., 1997, Biochemistry and molecular biology of sterol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry and Function of Sterols*, 85-99; Mercer, 1984, The biosynthesis of ergosterol. *Pestic. Sci.* 15(2), 133-55; Karst und Lacroute, 1977, Ergosterol Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 154, 269-
10 277).

Gene kodierend für die Mevalonat Kinase wurden bereits in verschiedenen Pilzen identifiziert: in den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* (Swissprot Accession No.: X55875) und *Schizosaccharomyces pombe* (Swissprot Accession No.: AB000541), oder in *Neurospora crassa* (Swissprot Accession No.: NCB11N2). Aus den pflanzenpathogenen Pilzen *Magnaporthe grisea* und
15 *Fusarium sporotrichioides* sind Sequenzfragmente des für die Mevalonat Kinase kodierenden Gens bekannt. Daneben wurde die Mevalonat Kinase auch in zahlreichen anderen Organismen gefunden, so z.B. in *Homo sapiens* (Swissprot: Accession No.: AK023087), *Mus musculus* (Swissprot: Accession No.: BC005606) oder *Oryza sativa* (Swissprot: Accession No.: AC091749).

- 20 Die Sequenzähnlichkeiten zwischen verschiedenen MKs sind innerhalb der eukaryontischen Klassen signifikant, während hingegen die Sequenzidentität zu den bakteriellen Enzymen weniger signifikant ist.

Die Mevalonat Kinase wurde aus verschiedenen Organismen isoliert, exprimiert, gereinigt und auch charakterisiert (Tanaka et al., 1990, Purification and regulation of mevalonate kinase from rat
25 liver *J. Biol. Chem.* 265(4), 2391-98; Chu, Xiusheng und Li, Ding, 2003, Cloning, expression, and purification of His-tagged rat mevalonate kinase. *Prot. Exp. Purific.* 27, 165-70; Schulte et al., 2000, Purification and characterization of mevalonate kinase from suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Arc. Biochem. Biophys.* 378(2), 287-298; Oulmouden und Karst, 1991, Nucleotide sequence of the ERG12 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding mevalonate
30 kinase. *Curr. Genet.* 19, 9-14).

In der vorliegenden Erfindung wird nun zum ersten Mal die vollständige Sequenz einer Mevalonat Kinase aus dem pflanzenpathogenen Pilz *Ustilago maydis* zur Verfügung gestellt, die die weitere

Erforschung von Mevalonat Kinasen insbesondere aus pflanzenpathogenen Pilzen und damit die Erschließung eines neuen Zielproteins für die Identifizierung neuer fungizider Wirkstoffe ermöglicht.

5 Trotz umfangreicher Forschungen an der Mevalonat Kinase war bislang unbekannt, dass die Mevalonat Kinase in Pilzen ein Zielprotein (ein so genanntes "Target") fungizid wirksamer Substanzen sein kann.

Für bereits bekannte Inhibitoren der Mevalonat Kinase wurde keine fungizide Wirkung beschrieben (siehe z.B. Hinson et al., 1997, Post-translational regulation of mevalonate kinase by intermediates of the cholesterol and nonsterol isoprene biosynthetic pathways. *J. Lipid Res.* 38, 2216-2223; Tanaka et al., 1990). Zwar verweisen verschiedene Veröffentlichungen auf die besondere
10 Rolle der Mevalonat Kinase (z.B. Oulmouden und Karst, 1991) für den Stoffwechsel von Pilzen wie z.B. des Hefepilzes *Saccharomyces cerevisiae* und beschreiben auch, dass die Zerstörung des Hefe-Gens ERG12, welches für die Mevalonat Kinase kodiert, für *S. cerevisiae* letal ist (Oulmouden und Karst, 1990, Isolation of the *ERG12* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding
15 mevalonate kinase. *Gene*, 88, 253-257). Keine der Veröffentlichungen nimmt jedoch Stellung zu der Frage, ob das Enzym Mevalonat Kinase durch Wirkstoffe beeinflusst, z.B. inhibiert werden kann, und ob eine Behandlung von Pilzen *in vivo* mit einem die Mevalonat Kinase modulierenden Wirkstoff zur Bekämpfung dieser Pilze möglich ist. Die Mevalonat Kinase wurde damit als Zielprotein für Fungizide bislang noch nicht beschrieben. Es sind keine Wirkstoffe bekannt, die eine
20 fungizide Wirkung aufweisen und deren Wirkort die Mevalonat Kinase ist.

Damit wird in der vorliegenden Erfindung zum ersten Mal gezeigt, dass die Mevalonat Kinase nicht nur ein insbesondere für Pilze wichtiges Enzym darstellt und deshalb in besonderem Maße dazu geeignet ist, als Zielprotein für die Suche nach weiteren und verbesserten fungizid wirksamen Wirkstoffen verwendet zu werden, sondern auch, dass die pilzliche Mevalonat Kinase tatsächlich
25 *in vitro* und auch *in vivo* durch Wirkstoffe beeinflusst werden kann und dass diese als Fungizide verwendet werden können. Weiterhin werden Verfahren zur Verfügung gestellt, die zur Identifizierung solcher Fungizide verwendet werden können.

So wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Verfahren entwickelt, das geeignet ist, die enzymatische Aktivität der Mevalonat Kinase sowie die Hemmung dieser Aktivität durch eine oder
30 mehrere Substanzen in einem so genannten Hemmtest zu bestimmen, und auf diese Weise Modulatoren, bevorzugt Inhibitoren des Enzyms, z.B. in HTS- und UHTS-Verfahren zu identifizieren. Identifizierte Inhibitoren, die *in vitro* bereits eine inhibierende Wirkung auf eine gegebene Mevalonat Kinase zeigen, können dann *in vivo* auf ihre fungizide Wirkung geprüft werden.

Die Inhibitoren einer pilzlichen Mevalonat Kinase können als Fungizide insbesondere im Pflanzenschutz oder auch als Antimykotika in Pharmaindikationen verwendet werden. In der vorliegenden Erfindung wird beispielsweise gezeigt, dass die Hemmung der Mevalonat Kinase mit einer in einem erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten Substanz zum Absterben oder zur Schädigung der behandelten Pilze in synthetischen Medien bzw. auf der Pflanze führt.

Mevalonat Kinase kann aus verschiedenen pflanzen- oder auch human- oder tierpathogenen Pilzen gewonnen werden, z.B. aus Pilzen wie dem pflanzenpathogenen Pilz *U. maydis*. Zur Gewinnung der Mevalonat Kinase aus Pilzen kann das Gen z.B. rekombinant in *Escherichia coli* exprimiert und aus *E. coli* Zellen eine Enzympräparation hergestellt werden (Beispiel 1). Bevorzugt werden Mevalonat Kinasen aus pflanzenpathogenen Pilzen verwendet, um im Pflanzenschutz einsetzbare Fungizide zu identifizieren. Ist das Ziel die Identifizierung von Fungiziden bzw. Antimycotika, die in Pharmaindikationen verwendet werden sollen, empfiehlt sich der Einsatz von Mevalonat Kinasen aus human- bzw. tierpathogenen Pilzen.

Um eine Mevalonat Kinase aus einem pflanzenpathogenen Pilz zur Verfügung zu stellen, wurde für die Expression der von *Umerg12* (*Um* steht für *Ustilago maydis*) gemäß SEQ ID NO:1 kodierten Mevalonat Kinase UmErg12 der zugehörige ORF (open reading frame) aus genomischer DNA nach dem Fachmann bekannten Methoden über genspezifische Primer amplifiziert. Die entsprechende DNA wurde gemäß den Angaben des Herstellers in den Vektor pDEST15 (Invitrogen, ermöglicht die Einführung eines N- terminalen GST-Tags) kloniert. Das resultierende Plasmid pDEST15_umerg12 enthält die vollständige kodierende Sequenz von *Umerg12* in einer N-terminalen Fusion mit einem GST-Tag aus dem Vektor. Das UmErg12 Fusionsprotein besitzt eine berechnete Masse von 74,5 kDa (vgl. Beispiel 1 und Abbildung 3).

Das Plasmid pDEST15_umerg12 wurde dann zur rekombinanten Expression von UmErg12 in *E. coli* BL21 (DE3) verwendet (vgl. Beispiel 1).

In der vorliegenden Erfindung wird damit auch eine weitere vollständige genomische Sequenz eines pflanzenpathogenen Pilzes kodierend für eine Mevalonat Kinase zur Verfügung gestellt, und deren Verwendung bzw. die Verwendung des davon kodierten Polypeptids zur Identifizierung von Inhibitoren des Enzyms sowie deren Verwendung als Fungizide beschrieben.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist deshalb auch die für ein Polypeptid mit der enzymatischen Funktion einer Mevalonat Kinase kodierende Nukleinsäure aus dem Pilz *Ustilago maydis*.

Mevalonat Kinasen teilen sich homologe Bereiche. Typisch für Mevalonat Kinasen ist eine konservierte Region, die bei der Bindung von ATP beteiligt ist.

Diese ATP-Bindungsstelle ist ein für Mevalonat Kinasen charakteristisches Sequenzmerkmal. Durch eine geeignete Suche in der PROSITE database kann ein solches Motiv identifiziert werden (Hofmann K., Bucher P., Falquet L., Bairoch A. (1999) "The PROSITE database, its status in 1999". *Nucleic Acids Res.* 27, 215). Es kann wie folgt dargestellt werden:

5 [LIVM]-[PK]-x-[GSTA]-x(0,1)-G-[LM]-[GS]-S-S-[GSA]-[GSTAC],

PROSITE ermöglicht Polypeptiden eine Funktion zuzuordnen und somit Mevalonat Kinasen als solche zu erkennen.

Bei der Darstellung des Prosite Motivs wird der "Ein-Buchstaben-Code" verwendet. Das Symbol "x" steht für eine Position, an der jede Aminosäure akzeptiert wird. Eine variable Position, an der verschiedene bestimmte Aminosäuren akzeptiert werden, wird in eckigen Klammern "[...]" dargestellt, wobei die an dieser Position möglichen Aminosäuren aufgezählt werden. Aminosäuren, die an einer bestimmten Position nicht akzeptiert werden, stehen dagegen in geschweiften Klammern "{...}". Ein Gedankenstrich "-" trennt die einzelnen Elemente bzw. Positionen des Motivs. Wiederholt sich eine bestimmte Position, z.B. "x", mehrfach hintereinander, kann dies durch Angabe der Zahl der Wiederholungen in einer nachfolgenden Klammer dargestellt werden, z.B. "x (3)", was für "x-x-x" steht.

Ein Prosite Motiv stellt also letztlich die Komponenten einer Konsensussequenz dar, sowie Abstände zwischen den beteiligten Aminosäuren und ist damit typisch für eine bestimmte Enzymklasse. Anhand dieses Motivs können auf Basis der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren weitere Polypeptide aus pflanzenpathogenen Pilzen identifiziert bzw. zugeordnet werden, die zur selben Klasse wie das erfindungsgemäße Polypeptid gehören und deshalb auch in erfindungsgemäßer Weise verwendet werden können.

Im Falle der Mevalonat Kinase aus *U. maydis* liegt dieses Motiv ebenso vor wie bei *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Magnaporthe grisea* oder *N. crassa* (vgl. Abbildung 2). Die spezifische Konsensussequenz für eine erfindungsgemäße Mevalonat Kinase, die zur Identifizierung bzw. Zuordnung weiterer erfindungsgemäßer Polypeptide genutzt werden kann, ist deshalb bevorzugt

P-x-G-x-G-L-G-S-S-A,

und besonders bevorzugt die Konsensussequenz

P-I-G-A-G-L-G-S-S-A.

Das oben genannte Prosite Motiv bzw. die spezifische Konsensussequenz sind typisch für die erfindungsgemäßen Polypeptide, die anhand dieser Konsensussequenzen strukturell definiert werden können und damit auch eindeutig identifizierbar sind.

- Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind deshalb auch Polypeptide aus pflanzenpathogenen Pilzen mit der enzymatischen Aktivität einer Mevalonat Kinase, die das vorstehend genannte Prosite Motiv [LIVM]-[PK]-x-[GSTA]-x(0,1)-G-[LM]-[GS]-S-S-[GSA]-[GSTAC] umfassen, bevorzugt solche Polypeptide, die das vorstehend genannte Motiv P-x-G-x-G-L-G-S-S-A umfassen, und besonders bevorzugt solche Polypeptide, die die Konsensussequenz P-I-G-A-G-L-G-S-S-A umfassen.
- 10 Aufgrund der Homologien, die bei speziesspezifischen Nukleinsäuren kodierend für Mevalonat Kinasen vorliegen, können auch Mevalonat Kinasen aus anderen pflanzenpathogenen Pilzen identifiziert und verwendet werden, um die oben gestellte Aufgabe zu lösen, d.h. sie können ebenfalls zum Identifizieren von Inhibitoren einer Mevalonat Kinase verwendet werden, welche wiederum als Fungizide im Pflanzenschutz verwendet werden können. Es ist jedoch auch denkbar einen
- 15 anderen Pilz, der nicht pflanzenpathogen ist, bzw. dessen Mevalonat Kinase oder die dafür kodierende Sequenz zu verwenden, um fungizid wirkende Inhibitoren der Mevalonat Kinase zu identifizieren. Aufgrund der hier angegebenen Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 und eventuell davon abgeleiteten Primern sowie gegebenenfalls unter Zuhilfenahme des vorstehend gezeigten Prosite Motivs ist es dem Fachmann möglich, z.B. mittels PCR weitere für Mevalonat Kinasen kodierende
- 20 Nukleinsäuren aus anderen (pflanzenpathogenen) Pilzen zu erhalten und zu identifizieren. Solche Nukleinsäuren und deren Verwendung in Verfahren zum Identifizieren von fungiziden Wirkstoffen werden als von der vorliegenden Erfindung umfasst betrachtet.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind insbesondere bevorzugt die für die Mevalonat Kinase aus *Ustilago maydis* kodierenden Nukleinsäuren mit der SEQ ID NO:1 sowie die für die Polypeptide gemäß SEQ ID NO:2 oder aktive Fragmente davon kodierenden Nukleinsäuren.

Bei den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren handelt es sich insbesondere um einzelsträngige oder doppelsträngige Desoxyribonukleinsäuren (DNA) oder Ribonukleinsäuren (RNA). Bevorzugte Ausführungsformen sind Fragmente genomischer DNA, und cDNAs.

Besonders bevorzugt umfassen die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren eine Sequenz ausgewählt aus

- a) einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1,

- b) Sequenzen, die für ein Polypeptid kodieren, welches die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2 umfasst und
- c) Sequenzen, welche eine zumindest 90 %-ige Identität mit den unter a) und b) definierten Sequenzen aufweisen und für das Sequenzmotiv [LIVM]-[PK]-x-[GSTA]-x(0,1)-G-[LM]-[GS]-S-S-[GSA]-[GSTAC] kodieren.

Wie bereits vorstehend ausgeführt, ist die vorliegende Erfindung nicht nur auf die Verwendung von Mevalonat Kinase aus *U. maydis* beschränkt. In analoger und dem Fachmann bekannter Weise können auch aus anderen Pilzen, vorzugsweise aus pflanzenpathogenen Pilzen, Polypeptide mit der enzymatischen Aktivität einer Mevalonat Kinase verwendet oder gewonnen werden, die dann in einem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden können. Bevorzugt wird die Mevalonat Kinase aus *U. maydis* verwendet.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind weiterhin DNA-Konstrukte, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure und einen homologen oder heterologen Promotor umfassen.

Der Ausdruck "homologer Promotor", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf einen Promotor, der im Ursprungsorganismus die Expression des betreffenden Gens kontrolliert. Der Ausdruck "heterologer Promotor", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf einen Promotor, der andere Eigenschaften als derjenige Promotor aufweist, der im Ursprungsorganismus die Expression des betreffenden Gens kontrolliert.

Die Auswahl von heterologen Promotoren ist davon abhängig, ob zur Expression pro- oder eukaryotische Zellen oder zellfreie Systeme verwendet werden. Beispiele für heterologe Promotoren sind der 35S Promoter des Blumenkohlmosaikvirus für pflanzliche Zellen, der Promoter der Alkoholdehydrogenase für Hefezellen, die T3-, T7- oder SP6-Promotoren für prokaryotische Zellen oder zellfreie Systeme.

Bevorzugt sollten pilzliche Expressionssysteme wie z.B. das *Pichia pastoris*-System verwendet werden, wobei hier die Transkription durch den Methanol induzierbaren AOX-Promotor angetrieben wird.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ferner Vektoren, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, eine erfindungsgemäße regulatorische Region oder ein erfindungsgemäßes DNA-Konstrukt enthalten. Als Vektoren können alle in molekularbiologischen Laboratorien verwendete Phagen, Plasmide, Phagmide, Phasmide, Cosmide, YACs, BACs, künstliche Chromosomen oder Partikel, die für einen Partikelbeschuss geeignet sind, verwendet werden.

Bevorzugte Vektoren sind z.B. die p4XXprom. Vektorserie (Mumberg, D., Müller, R., Funk, M., 1995. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. Gene 156, 119-122) für Hefezellen, pSPORT-Vektoren (Fa. Life Technologies) für bakterielle Zellen, oder den Gateway Vektoren (Fa. Life Technologies) für verschiedene Expressionssysteme in bakteriellen Zellen, Pflanzen, *P. pastoris*, *S. cerevisiae* oder Insektenzellen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Wirtszellen, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein erfindungsgemäßes DNA-Konstrukt oder einen erfindungsgemäßen Vektor enthalten.

Der Ausdruck "Wirtszelle", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf Zellen, die natürlicherweise die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren nicht enthalten.

Als Wirtszellen eignen sich sowohl prokaryotische Zellen, vorzugsweise *E. coli*, als auch eukaryotische Zellen, wie Zellen von *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, Insekten, Pflanzen, Froschoozyten und Zelllinien von Säugern.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind weiterhin Polypeptide mit der enzymatischen Aktivität einer Mevalonat Kinase, die von den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren kodiert werden.

Bevorzugt umfassen die erfindungsgemäßen Polypeptide eine Aminosäuresequenz ausgewählt aus

- (a) der Sequenz gemäß SEQ ID NO:2,
- (b) Sequenzen, welche eine 95 %ige Identität mit der unter a) definierten Sequenz haben, und das Sequenzmotiv [LIVM]-[PK]-x-[GSTA]-x(0,1)-G-[LM]-[GS]-S-S-[GSA]-[GSTAC] umfassen und
- (c) Fragmente der unter a) und b) angegebenen Sequenzen, welche die gleiche enzymatische Aktivität aufweisen wie die unter a) definierte Sequenz.

Der Ausdruck "Polypeptide", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich sowohl auf kurze Aminosäureketten, die gewöhnlich als Peptide, Oligopeptide oder Oligomere bezeichnet werden, als auch auf längere Aminosäureketten, die gewöhnlich als Proteine bezeichnet werden. Er umfasst Aminosäureketten, die entweder durch natürliche Prozesse, wie posttranslationale Prozessierung, oder durch chemische Verfahren, die Stand der Technik sind, modifiziert sein können. Solche Modifikationen können an verschiedenen Stellen und mehrfach in einem Polypeptid vorkommen, wie beispielsweise am Peptid-Rückgrat, an der Aminosäure-Seitenkette, am Amino- und/oder am Carboxy-Terminus. Sie umfassen beispielsweise Acetylierungen, Acylierungen, ADP-Ribosylierungen, Amidierungen, kovalente Verknüpfungen mit Flavinen, Häm-Anteilen, Nukleotiden oder

Nukleotid-Derivaten, Lipiden oder Lipid-Derivaten oder Phosphatidylinositol, Cyclisierungen, Disulfidbrückenbildungen, Demethylierungen, Cystin-Bildungen, Formylierungen, gamma-Carboxylierungen, Glycosylierungen, Hydroxylierungen, Iodierungen, Methylierungen, Myristoylierungen, Oxidationen, proteolytische Prozessierungen, Phosphorylierungen, Selenoylierungen und
5 tRNA-vermittelte Additionen von Aminosäuren.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können in Form "reifer" Proteine oder als Teile größerer Proteine, z.B. als Fusionsproteine, vorliegen. Weiterhin können sie Sezernierungs- oder "Leader"-Sequenzen, Pro-Sequenzen, Sequenzen, die eine einfache Reinigung ermöglichen, wie mehrfache Histidin-Reste, oder zusätzliche stabilisierende Aminosäuren aufweisen. Die erfindungsgemäßen
10 Proteine können ebenfalls so vorliegen, wie sie natürlicherweise in ihrem Herkunftsorganismus vorliegen, aus dem sie zum Beispiel direkt gewonnen werden können. In den erfindungsgemäßen Verfahren können ebenso aktive Fragmente einer Mevalonat Kinase eingesetzt werden, solange sie die Bestimmung der enzymatischen Aktivität des Polypeptids bzw. deren Inhibition durch eine Kandidatenverbindung ermöglichen.

15 Die in den erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten Polypeptide können im Vergleich zu den entsprechenden Regionen von natürlich vorkommenden Mevalonat Kinasen Deletionen oder Aminosäuresubstitutionen aufweisen, solange sie zumindest noch die enzymatische Aktivität einer vollständigen Mevalonat Kinase zeigen. Konservative Substitutionen sind bevorzugt. Solche konservativen Substitutionen umfassen Variationen, wobei eine Aminosäure durch eine andere
20 Aminosäure aus der folgenden Gruppe ersetzt wird:

1. Kleine aliphatische, nicht-polare oder wenig polare Reste: Ala, Ser, Thr, Pro und Gly;
2. Polare, negativ geladene Reste und deren Amide: Asp, Asn, Glu und Gln;
3. Polare, positiv geladene Reste: His, Arg und Lys;
4. Große aliphatische, nicht-polare Reste: Met, Leu, Ile, Val und Cys; und
- 25 5. Aromatische Reste: Phe, Tyr und Trp.

Ein mögliches Reinigungsverfahren der Mevalonat Kinase basiert auf präparativer Elektrophorese, FPLC, HPLC (z.B. unter Anwendung von Gelfiltrations-, Reversphasen- oder leicht hydrophoben Säulen), Gelfiltration, differentieller Präzipitation, Ionenaustausch-Chromatographie oder Affinitätschromatographie (vgl. Beispiel 1).

30 Ein schnelles Verfahren zum Isolieren von Mevalonat Kinasen, die von Wirtszellen synthetisiert werden, beginnt mit der Expression eines Fusionsproteins, wobei der Fusionspartner auf einfache Weise affinitätsgereinigt werden kann. Der Fusionspartner kann beispielsweise ein GST-Tag sein (vgl. Beispiel 1). Das Fusionsprotein kann dann an Glutathion-Sepharosesäule gereinigt werden.

Der Fusionspartner kann durch partielle proteolytische Spaltung beispielsweise an Linkern zwischen dem Fusionspartner und dem zu reinigenden erfindungsgemäßen Polypeptid abgetrennt werden. Der Linker kann so gestaltet werden, dass er Ziel-Aminosäuren, wie Arginin- und Lysin-Reste einschließt, die Stellen für eine Spaltung durch Trypsin definieren. Um solche Linker zu erzeugen, können Standard-Klonierungsverfahren unter Verwendung von Oligonukleotiden angewendet werden.

Weitere mögliche Reinigungsverfahren basieren wiederum auf präparativer Elektrophorese, FPLC, HPLC (z.B. unter Anwendung von Gelfiltrations-, Reversphasen- oder leicht hydrophoben Säulen), Gelfiltration, differentieller Präzipitation, Ionenaustausch-Chromatographie und Affinitätschromatographie.

Die Ausdrücke "Isolierung oder Reinigung", wie sie hierin verwendet werden, bedeuten, dass die erfindungsgemäßen Polypeptide von anderen Proteinen oder anderen Makromolekülen der Zelle oder des Gewebes abgetrennt werden. Vorzugsweise ist eine die erfindungsgemäßen Polypeptide enthaltende Zusammensetzung hinsichtlich des Proteingehalts gegenüber einer Präparation aus den Wirtszellen mindestens 10-fach und besonders bevorzugt mindestens 100-fach angereichert.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können auch ohne Fusionspartner mit Hilfe von Antikörpern, die an die Polypeptide binden, affinitätsgereinigt werden.

Das Verfahren zum Herstellen von Polypeptiden mit der enzymatischen Aktivität einer Mevalonat Kinase, wie z.B. des Polypeptids UmErg12, ist damit gekennzeichnet ist durch

- (a) das Kultivieren einer Wirtszelle enthaltend zumindest eine exprimierbare Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Polypeptid aus Pilzen mit der enzymatischen Aktivität einer Mevalonat Kinase unter Bedingungen, die die Expression dieser Nukleinsäure gewährleisten, oder
- (b) das Exprimieren einer exprimierbaren Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Polypeptid aus Pilzen mit der enzymatischen Aktivität einer Mevalonat Kinase in einem *in vitro*-System, und
- (c) die Gewinnung des Polypeptids aus der Zelle, dem Kulturmedium oder dem *in vitro*-System.

Die so erhaltenen Zellen enthaltend das erfindungsgemäße Polypeptid oder das so erhaltene gereinigte Polypeptid sind geeignet, in Verfahren zum Identifizieren von Modulatoren bzw. Inhibitoren der Mevalonat Kinase verwendet zu werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung von Polypeptiden aus Pilzen, bevorzugt aus pflanzenpathogenen bzw. human- oder tierpathogenen Pilzen, welche die enzymatische Aktivität einer Mevalonat Kinase besitzen, in Verfahren zum Identifizieren von Inhibitoren dieser Polypeptide, und die Verwendung dieser Inhibitoren der Mevalonat Kinase als Fungizide.

- 5 Fungizide Wirkstoffe, die mit Hilfe einer Mevalonat Kinase aus einer bestimmten Pilzspezies gefunden werden, können auch mit Mevalonat Kinasen aus anderen Pilzspezies interagieren, wobei die Interaktion mit den unterschiedlichen in diesen Pilzen vorkommenden Mevalonat Kinasen nicht immer gleich stark sein muss. Dies erklärt unter anderem die Selektivität wirksamer Substanzen. Die Verwendung von Wirkstoffen, die mit einer Mevalonat Kinase einer bestimmten Pilz-
- 10 Spezies gefunden wurden, als Fungizide auch bei anderen Pilz-Spezies kann darauf zurückgeführt werden, dass sich Mevalonat Kinasen aus verschiedenen Pilzspezies relativ nahe stehen und in größeren Bereichen eine ausgeprägte Homologie zeigen. So wird in Abbildung 2 deutlich, dass eine solche Homologie über beträchtliche Sequenzabschnitte hinweg zwischen *U. maydis*, *S. cerevisiae*, *N. crassa*, *S. pombe* und *M. grisea* besteht und damit die Wirkung der mit Hilfe der
- 15 Mevalonat Kinase aus *U. maydis* gefundenen Substanzen nicht auf *U. maydis* beschränkt bleibt. In Verfahren zum Identifizieren von Fungiziden werden deshalb bevorzugt Polypeptide mit der enzymatischen Aktivität einer Mevalonat Kinase verwendet, die eine Konsensussequenz gemäß Abbildung 2 aufweisen.

- Verfahren, die geeignet sind, Modulatoren, insbesondere Inhibitoren bzw. Antagonisten der
- 20 erfindungsgemäßen Polypeptide zu identifizieren, beruhen in aller Regel auf der Bestimmung der Aktivität bzw. der biologischen Funktionalität des Polypeptids. Dazu kommen prinzipiell sowohl auf ganzen Zellen beruhende Verfahren (*in vivo* Verfahren) in Frage, wie auch Verfahren, die auf der Verwendung des aus den Zellen isolierten Polypeptids beruhen, das in gereinigter oder teilweise gereinigter Form oder auch als Rohextrakt vorliegen kann. Diese zellfreien *in vitro*
- 25 Verfahren können ebenso wie *in vivo* Verfahren im Labormaßstab, in bevorzugter Weise aber auch in HTS oder UHTS Verfahren genutzt werden. Im Anschluss an die *in vivo* oder *in vitro* Identifizierung von Modulatoren des Polypeptids können Tests an Pilzkulturen durchgeführt werden, um die fungizide Wirksamkeit der gefundenen Verbindungen zu prüfen.

- Viele Testsysteme, die die Prüfung von Verbindungen und natürlichen Extrakten zum Ziel haben,
- 30 sind bevorzugt auf hohe Durchsatzzahlen ausgerichtet, um die Zahl der untersuchten Substanzen in einem gegebenen Zeitraum zu maximieren. Testsysteme, die auf zellfreiem Arbeiten beruhen, brauchen gereinigtes oder semi-gereinigtes Protein. Sie sind geeignet für eine "erste" Prüfung, die in erster Linie darauf abzielt, einen möglichen Einfluss einer Substanz auf das Zielprotein zu detektieren. Ist eine solche erste Prüfung erfolgt und eine oder mehrere Verbindungen, Extrakte

etc. gefunden, kann die Wirkung solcher Verbindungen im Labor noch gezielter untersucht werden. So kann in einem ersten Schritt die Inhibierung oder Aktivierung des erfindungsgemäßen Polypeptids *in vitro* noch einmal geprüft werden, um im Anschluss daran die Wirksamkeit der Verbindung am Zielorganismus, hier einem oder mehreren pflanzenpathogenen Pilzen, zu testen.

5 Die Verbindung kann dann gegebenenfalls als Ausgangspunkt für die weitere Suche und Entwicklung von fungiziden Verbindungen verwendet werden, die auf der ursprünglichen Struktur basieren, jedoch z.B. hinsichtlich Wirksamkeit, Toxizität oder Selektivität optimiert sind.

Um Modulatoren aufzufinden, kann z.B. ein synthetischer Reaktionsmix (z.B. Produkte der *in vitro* Transkription) oder ein zellulärer Bestandteil, wie eine Membran, ein Kompartiment oder irgend-

10 eine andere Präparation, die die erfindungsgemäßen Polypeptide enthält, zusammen mit einem gegebenenfalls markierten Substrat oder Liganden der Polypeptide in Gegenwart und Abwesenheit eines Kandidatenmoleküls, das ein Antagonist sein kann, inkubiert werden. Die Fähigkeit des Kandidatenmoleküls, die Aktivität der erfindungsgemäßen Polypeptide zu hemmen, wird z.B. erkennbar an einer verringerten Bindung des gegebenenfalls markierten Liganden oder an einer

15 verringerten Umsetzung des gegebenenfalls markierten Substrates. Moleküle, die die biologische Aktivität der erfindungsgemäßen Polypeptide hemmen, sind gute Antagonisten.

Ein Beispiel für ein Verfahren, mit welchem Modulatoren der erfindungsgemäßen Polypeptide aufgefunden werden können, ist ein Verdrängungstest, bei dem man unter dafür geeigneten Bedingungen die erfindungsgemäßen Polypeptide und einen potenziellen Modulator mit einem Molekül,

20 das bekanntermaßen an die erfindungsgemäßen Polypeptide bindet, wie einem natürlichen Substrat oder Liganden oder einem Substrat- oder Liganden-Mimetikum zusammenbringt. Die erfindungsgemäßen Polypeptide selbst können markiert werden, z.B. fluorimetrisch oder colorimetrisch, so dass man die Anzahl der Polypeptide, die an einen Liganden gebunden sind oder die eine Umsetzung mitgemacht haben, exakt bestimmen kann. Ebenso kann jedoch die Bindung mittels des

25 gegebenenfalls markierten Substrats, Liganden bzw. Substratanalogen verfolgt werden. Auf diese Weise lässt sich die Effektivität von Antagonisten ermitteln.

Effekte wie Zelltoxizität werden in diesen *in vitro* Systemen in der Regel ignoriert. Die Testsysteme überprüfen dabei sowohl inhibierende bzw. suppressive Effekte der Substanzen, als auch stimulatorische Effekte. Die Effektivität einer Substanz kann durch konzentrationsabhängige Test-

30 reihen überprüft werden. Kontrollansätze ohne Testsubstanzen bzw. ohne Enzym können zur Bewertung der Effekte herangezogen werden.

Durch die anhand der vorliegenden Erfindung verfügbaren, für eine erfindungsgemäße Mevalonat Kinase kodierende Nukleinsäuren enthaltenden Wirtszellen, wird die Entwick-

lung von Testsystemen, die auf Zellen basieren, zur Identifizierung von Substanzen ermöglicht, die die Aktivität der erfindungsgemäßen Polypeptide modulieren.

Vorzugsweise handelt es sich bei den zu identifizierenden Modulatoren um kleine organisch-chemische Verbindungen.

5 Ein Verfahren zum Identifizieren einer Verbindung, die die Aktivität einer Mevalonat Kinase aus Pilzen moduliert und die als Fungizid im Pflanzenschutz verwendet werden kann, besteht demnach bevorzugt darin, dass man

a) ein Polypeptid mit der enzymatischen Aktivität einer Mevalonat Kinase, bevorzugt aus Pilzen und besonders bevorzugt aus pflanzenpathogenen Pilzen,

10 oder eine Wirtszelle enthaltend ein solches Polypeptid mit einer chemischen Verbindung oder mit einem Gemisch von chemischen Verbindungen unter Bedingungen in Kontakt bringt, die die Interaktion der chemischen Verbindungen mit dem Polypeptid erlauben,

b) die Aktivität dieses Polypeptids bei Abwesenheit der chemischen Verbindung mit der Aktivität des Polypeptids bei Anwesenheit der chemischen Verbindung oder des
15 Gemisches von chemischen Verbindungen vergleicht,

c) die chemische Verbindung auswählt, die die Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids spezifisch moduliert, und gegebenenfalls

d) die fungizide Wirkung der ausgewählten Verbindung *in vivo* prüft.

20 Besonders bevorzugt wird dabei diejenige Verbindung bestimmt, die die Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids spezifisch inhibiert. Der Begriff "Aktivität", wie er hier verwendet wird, bezieht sich auf die biologische Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Tatsache genutzt, dass bei der Reaktion der Mevalonat Kinase ein Molekül Adenosindiphosphat (ADP) freigesetzt wird. Die Aktivität bzw. die Ab- oder Zunahme der Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids kann deswegen durch den
25 Nachweis des entstehenden ADP bestimmt werden. Dabei wird die geringere bzw. inhibierte Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids anhand des Nachweises des entstehenden ADP durch Kopplung an die nachgeschaltete Reaktion der Pyruvat Kinase und Laktat Dehydrogenase verfolgt. Die Pyruvatkinase setzt dabei unter Verbrauch von ADP Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat um, welches wiederum von der Laktat Dehydrogenase zur Oxidation von NADH zu NAD verwendet wird.
30 Die durch die gekoppelte Reaktion steigende NAD-Konzentration bzw. abnehmende NADH-Kon-

zentration kann photospektrometrisch durch Absorptions- oder Fluoreszenzmessung (bei 340 nm bzw. einer Anregungswellenlänge von 360nm und einer Emissionswellenlänge von 465nm) bestimmt werden.

Die Messung kann auch in für HTS- oder UHTS-Assays gängigen Formaten erfolgen, z.B. in Mikrotiterplatten, in denen z.B. ein Gesamtvolumen von 5 bis 50 µl pro Ansatz bzw. pro Well vorgelegt wird und die einzelnen Komponenten in der gewünschten Endkonzentrationen vorliegen (vgl. Beispiel 2). Dabei wird die zu testende, potentiell die Aktivität des Enzyms inhibierende oder aktivierende Verbindung (Kandidatenmolekül) z.B. in einer geeigneten Konzentration in Testpuffer enthaltend Mevalonat, Adenosintriphosphat, Phosphoenolpyruvat und die gekoppelten Hilfsenzyme Pyruvat Kinase und Laktat Dehydrogenase vorgelegt. Dann wird das erfindungsgemäße Polypeptid in Testpuffer zugegeben und die Reaktion dadurch gestartet. Der Ansatz wird dann bei einer geeigneten Temperatur inkubiert und die Absorptionsabnahme bei 340 nm gemessen. Die Inkubationsdauer kann dabei über einen größeren Zeitraum variiert werden. Bevorzugt erfolgt eine Inkubation für 5 bis 60, bevorzugt für 15 bis 45 Minuten, im Mittel also etwa 30 Minuten. Der gekoppelte Enzymtest wird z.B. in Tanaka et al., 1990, beschrieben.

Eine weitere Messung erfolgt in einem entsprechenden Ansatz, jedoch ohne Zugabe eines Kandidatenmoleküls und ohne Zugabe eines erfindungsgemäßen Polypeptids (Negativkontrolle). Eine weitere Messung erfolgt wiederum bei Abwesenheit eines Kandidatenmoleküls, jedoch bei Anwesenheit des erfindungsgemäßen Polypeptids (Positivkontrolle). Negativ- und Positivkontrolle ergeben damit die Vergleichswerte zu den Ansätzen bei Anwesenheit eines Kandidatenmoleküls.

Um optimale Bedingungen für ein Verfahren zum Identifizieren von Inhibitoren der Mevalonat Kinase bzw. zur Bestimmung der Aktivität der erfindungsgemäßen Polypeptide zu ermitteln, kann es vorteilhaft sein, den jeweiligen K_M -Wert des verwendeten erfindungsgemäßen Polypeptids zu bestimmen. Dieser gibt dann Aufschluss über die bevorzugt zu verwendende Konzentration des bzw. der Substrate. Im Fall der Mevalonat Kinase aus *U. maydis* konnte ein K_M von 130 µM für Adenosintriphosphat und ein K_M von 200 µM für Mevalonat bestimmt werden.

Mit Hilfe der vorstehend beispielhaft beschriebenen Verfahren konnten im Rahmen der vorliegenden Erfindung Verbindungen identifiziert werden, die die pilzliche Mevalonat Kinase inhibieren, und die in der Lage sind, Pilze verschiedener Spezies zu schädigen (z.B. Wachstumshemmung) bzw. abzutöten.

Es versteht sich von selbst, dass neben den genannten Verfahren zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität einer Mevalonat Kinase bzw. der Inhibition dieser Aktivität und zum Identifizieren von Fungiziden auch andere, z.B. bereits bekannte, Verfahren bzw. Hemmtests verwendet wer-

den können, solange diese Verfahren es gestatten, die Aktivität einer Mevalonat Kinase zu bestimmen und eine Inhibition dieser Aktivität durch eine Kandidatenverbindung zu erkennen. Ein alternatives Verfahren beruht z.B. auf dem Einsatz radioaktiv markierten ATPs (Oulmouden und Karst, 1991).

- 5 Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren konnten auf diese Weise Inhibitoren der Mevalonat Kinase identifiziert werden.

In Tabelle I wird beispielhaft eine Verbindung gezeigt, die mit einem erfindungsgemäßen Verfahren als ein Inhibitor der Mevalonat Kinase identifiziert werden konnte.

Tabelle I

Beispiel	Verbindung
1	

- 10 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung konnte weiter gezeigt werden, dass die mit Hilfe eines erfindungsgemäßen Verfahrens identifizierten Inhibitoren einer erfindungsgemäßen Mevalonat Kinase geeignet sind, Pilze zu schädigen oder abzutöten.

Dazu kann z.B. in die Kavitäten von Mikrotiterplatten eine Lösung des zu prüfenden Wirkstoffs pipettiert werden. Nachdem das Lösungsmittel abgedampft ist, wird zu jeder Kavität Medium
 15 hinzugefügt. Das Medium wird vorher mit einer geeigneten Konzentration von Sporen bzw. Mycel des zu prüfenden Pilzes versetzt. Die resultierenden Konzentrationen des Wirkstoffes betragen z.B. 0,1, 1, 10 und 100 ppm.

Die Platten werden anschließend auf einem Schüttler bei einer Temperatur von etwa 22°C inkubiert, bis in der unbehandelten Kontrolle ein ausreichendes Wachstum feststellbar ist.

- 20 Die Auswertung erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 620 nm. Aus den Messdaten der verschiedenen Konzentrationen kann die Wirkstoffdosis bestimmt werden, die zu einer 50 %-igen Hemmung des Pilzwachstums gegenüber der unbehandelten Kontrolle führt (ED₅₀). Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass mit einem erfindungsgemäßen Verfahren Inhibitoren der Mevalonat Kinase identifiziert werden konnten, die eine fungizide Wirkung *in vivo* besitzen.

In Tabelle II sind die Ergebnisse eines solchen Tests als ED₅₀-Werte für eine in einem erfindungsgemäßen Verfahren gefundene Verbindung (vgl. Tab. I) beispielhaft wiedergegeben. Die Verbindung zeigt bei verschiedenen Pilzen eine fungizide Wirkung.

Tabelle II

<u>Verbindung</u> (Bsp.)	<u>Organismus</u>	<u>ED₅₀ [ppm]</u>
1	<i>Botrytis cinerea</i>	0,37
1	<i>Pyricularia oryzae</i>	<0,10
1	<i>Aspergillus nidulans</i>	0,28

5

Die vorliegende Erfindung bezieht sich daher ebenfalls auf die Verwendung von Modulatoren der Mevalonat Kinase aus Pilzen, bevorzugt aus pflanzenpathogenen Pilzen als Fungizide und auf Verfahren zum Bekämpfen von Pilzbefall bei Pflanzen, indem man einen Inhibitor der pilzlichen Mevalonat Kinase auf den Pilz bzw. die vom Pilz befallene Pflanze einwirken lässt.

- 10 Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf Fungizide, die mit Hilfe eines erfindungsgemäßen Verfahrens identifiziert wurden.

Verbindungen, die mit Hilfe eines erfindungsgemäßen Verfahrens identifiziert werden, und die aufgrund der Inhibition der pilzlichen Mevalonat Kinase eine fungizide Wirkung aufweisen, können somit zur Herstellung von fungiziden Mitteln verwendet werden.

- 15 Die identifizierten Wirkstoffe können in Abhängigkeit von ihren jeweiligen physikalischen und/oder chemischen Eigenschaften in die üblichen Formulierungen überführt werden, wie Lösungen, Emulsionen, Suspensionen, Pulver, Schäume, Pasten, Granulate, Aerosole, Feinstverkapselungen in polymeren Stoffen und in Hüllmassen für Saatgut, sowie ULV-Kalt- und Warmnebel-Formulierungen.

- 20 Diese Formulierungen werden in bekannter Weise hergestellt, z.B. durch Vermischen der Wirkstoffe mit Streckmitteln, also flüssigen Lösungsmitteln, unter Druck stehenden verflüssigten Gasen und/oder festen Trägerstoffen, gegebenenfalls unter Verwendung von oberflächenaktiven Mitteln, also Emulgiermitteln und/oder Dispergiermitteln und/oder schaum erzeugenden Mitteln. Im Falle der Benutzung von Wasser als Streckmittel können z.B. auch organische Lösungsmittel als Hilfslösungs-

- 25 mittel verwendet werden. Als flüssige Lösungsmittel kommen im wesentlichen in Frage: Aromaten, wie Xylol, Toluol oder Alkyl-naphthaline, chlorierte Aromaten oder chlorierte aliphatische Kohlenwasserstoffe, wie Chlorbenzole, Chlorethylene oder Methylenchlorid, aliphatische Kohlenwasser-

stoffe, wie Cyclohexan oder Paraffine, z.B. Erdölfractionen, Alkohole, wie Butanol oder Glycol sowie deren Ether und Ester, Ketone, wie Aceton, Methylethylketon, Methylisobutylketon oder Cyclohexanon, stark polare Lösungsmittel, wie Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid, sowie Wasser. Mit verflüssigten gasförmigen Streckmitteln oder Trägerstoffen sind solche Flüssigkeiten gemeint, welche bei normaler Temperatur und unter Normaldruck gasförmig sind, z.B. Aerosol-Treibgase, wie Halogenkohlenwasserstoffe sowie Butan, Propan, Stickstoff und Kohlendioxid. Als feste Trägerstoffe kommen in Frage: z.B. natürliche Gesteinsmehle, wie Kaoline, Tonerden, Talkum, Kreide, Quarz, Attapulgit, Montmorillonit oder Diatomeenerde und synthetische Gesteinsmehle, wie hochdisperse Kieselsäure, Aluminiumoxid und Silikate. Als feste Trägerstoffe für Granulate kommen in Frage: z.B. gebrochene und fraktionierte natürliche Gesteine wie Calcit, Marmor, Bims, Sepiolith, Dolomit sowie synthetische Granulate aus anorganischen und organischen Mehlen sowie Granulate aus organischem Material wie Sägemehl, Kokosnußschalen, Maiskolben und Tabakstengel. Als Emulgier und/oder schaumerzeugende Mittel kommen in Frage: z.B. nichtionogene und anionische Emulgatoren, wie Polyoxyethylen-Fettsäureester, Polyoxyethylen-Fettalkoholether, z.B. Alkylarylpolyglycoether, Alkylsulfonate, Alkylsulfate, Arylsulfonate sowie Eiweißhydrolysate. Als Dispergiermittel kommen in Frage: z.B. Lignin-Sulfitablaugen und Methylcellulose.

Es können in den Formulierungen Haftmittel wie Carboxymethylcellulose, natürliche und synthetische pulverige, körnige oder latexförmige Polymere verwendet werden, wie Gummiarabicum, Polyvinylalkohol, Polyvinylacetat, sowie natürliche Phospholipide, wie Kephaline und Lecithine, und synthetische Phospholipide. Weitere Additive können mineralische und vegetabile Öle sein.

Es können Farbstoffe wie anorganische Pigmente, z.B. Eisenoxid, Titanoxid, Ferrocyanblau und organische Farbstoffe, wie Alizarin-, Azo- und Metallphthalocyaninfarbstoffe und Spurennährstoffe, wie Salze von Eisen, Mangan, Bor, Kupfer, Kobalt, Molybdän und Zink verwendet werden.

Die Formulierungen enthalten im allgemeinen zwischen 0,1 und 95 Gewichtsprozent Wirkstoff, vorzugsweise zwischen 0,5 und 90 %.

Die erfindungsgemäßen Wirkstoffe können als solche oder in ihren Formulierungen auch in Mischung mit bekannten Fungiziden, Bakteriziden, Akariziden, Nematiziden oder Insektiziden verwendet werden, um so z.B. das Wirkungsspektrum zu verbreitern oder Resistenzentwicklungen vorzubeugen. In vielen Fällen erhält man dabei synergistische Effekte, d.h. die Wirksamkeit der Mischung ist größer als die Wirksamkeit der Einzelkomponenten.

Beim Einsatz der erfindungsgemäßen Verbindungen als Fungizide können die Aufwandmengen je nach Applikation innerhalb größerer Bereiche variiert werden.

Erfindungsgemäß können alle Pflanzen und Pflanzenteile behandelt werden. Unter Pflanzen werden hierbei alle Pflanzen und Pflanzenpopulationen verstanden, wie erwünschte und unerwünschte Wildpflanzen oder Kulturpflanzen (einschließlich natürlich vorkommender Kulturpflanzen). Kulturpflanzen können Pflanzen sein, die durch konventionelle Züchtungs- und Optimierungsmethoden oder durch biotechnologische und gentechnologische Methoden oder Kombinationen dieser Methoden erhalten werden können, einschließlich der transgenen Pflanzen und einschließlich der durch Sortenschutzrechte schützbaren oder nicht schützbaren Pflanzensorten. Unter Pflanzenteilen sollen alle oberirdischen und unterirdischen Teile und Organe der Pflanzen, wie Spross, Blatt, Blüte und Wurzel verstanden werden, wobei beispielhaft Blätter, Nadeln, Stängel, Stämme, Blüten, Fruchtkörper, Früchte und Samen sowie Wurzeln, Knollen und Rhizome aufgeführt werden. Zu den Pflanzenteilen gehört auch Erntegut sowie vegetatives und generatives Vermehrungsmaterial, beispielsweise Stecklinge, Knollen, Rhizome, Ableger und Samen.

Die erfindungsgemäße Behandlung der Pflanzen und Pflanzenteile mit den Wirkstoffen erfolgt direkt oder durch Einwirkung auf deren Umgebung, Lebensraum oder Lagerraum nach den üblichen Behandlungsmethoden, z.B. durch Tauchen, Sprühen, Verdampfen, Vernebeln, Streuen, Aufstreichen und bei Vermehrungsmaterial, insbesondere bei Samen, weiterhin durch ein- oder mehrschichtiges Umhüllen.

Die nachfolgenden Beispiele illustrieren verschiedene Aspekte der vorliegenden Erfindung und sind nicht limitierend auszulegen.

BeispieleBeispiel 1Klonierung, Expression und Reinigung von *umerg12* bzw. UmErg12 aus *Ustilago maydis*

Für die Klonierung von *Umerg12* bzw. dessen Expression wurde der ORF aus genomischer DNA aus *Ustilago maydis* über genspezifische Primer amplifiziert. Die entsprechende DNA, ein Amplikon von 1059 bp Länge, wurde in den Vektor pDON201 von Invitrogen zwischenkloniert und anschließend über Rekombination in den Vektor pDEST15 (Invitrogen) kloniert. Das resultierende Plasmid pDEST15_umerg12 enthält die vollständige kodierende Sequenz von *umerg12* in einer N-terminalen Fusion mit dem GST-Tag, das Bestandteil des Vektors ist. Das UmErg12 Fusionsprotein besitzt eine berechnete Masse von 74,5 kDa.

Für die heterologe Expression wurde das Plasmid pDEST15_umerg12 in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Von den Transformanten wurde eine Vorkultur in 50 ml Selektionsmedium angeimpft. Diese Zellen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend 1:20 in Selektionsmedium (LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin) verdünnt. Die Induktion erfolgte bei einer OD_{600nm} von 0,8 mit 0,1 mM IPTG (Endkonzentration) bei 30°C. Nach 3 h Induktion wurden die Zellen geerntet und direkt aufgearbeitet.

Der Aufschluss erfolgte durch Sonifizieren in Lysepuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8, 5 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 0,1 % Triton, 10 µM ATP) nach vorangegangener Lysozym Behandlung (15 Minuten, 30°C, 1 mg/ml final in Lysepuffer). Die durch Zentrifugation (15 min bei 4°C, 10 000 g) erhaltene Cytoplasmafraktion wurde für die Aufreinigung des exprimierten Proteins verwendet. Nach Filtration durch eine 0,45 µm Nalgene Filtrationseinheit erfolgte die Reinigung nach dem Standardprotokoll des Herstellers für Glutathion-Sepharose Säulen unter Verwendung des folgenden Laufpuffers (100 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10 µM ATP, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 10 % Glycerin). Als Elutionspuffer wurde 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 10 µM ATP, 10 % Glycerin mit 20 mM reduziertem Glutathion verwendet. Das gereinigte Protein wurde bei -80°C gelagert. Aus 250 ml Kulturmedium konnte etwa 2,5 mg lösliches Protein isoliert werden, das in Verfahren zum Identifizieren von Modulatoren der Mevalonat Kinase verwendet werden konnte.

Beispiel 2

(A) Identifizierung von Modulatoren der Mevalonat Kinase in 384-Well-MTP in einem gekoppelten Assay

Zur Identifizierung von Modulatoren der Mevalonat Kinase wurden 384-Well-Mikrotiterplatten von Greiner verwendet.

In die erste und zweite Spalte wurde die Negativ-Kontrolle pipettiert. Diese setzte sich zusammen aus 5 µl Lösung1 (5 % DMSO in H₂O), 20 µl Lösung2 (100 mM Tris/HCl pH 7,5, 15 mM MgCl₂, 12,5 mM Glutathion, 0,25 % BSA) und 25 µl Lösung 3 (100 mM Tris/HCl pH 7,5, 15 mM MgCl₂, 20 mM KCl, 0,6 mM ATP, 0,8 mM PEP, 0,6 mM NADH, 20 mM DTT, 0,02 % Tween 20) mit 200 mU Pyruvat Kinase, 400 mU Lactat Dehydrogenase.

In die dritte und vierte Spalte wurde die Positiv-Kontrolle pipettiert. Diese setzte sich zusammen aus 5 µl Lösung1 (5 % DMSO in H₂O), 20 µl Lösung4 (100 mM Tris/HCl pH 7,5, 15 mM MgCl₂, 12,5 mM Glutathion, 0,25 % BSA, 0,1 µg Mevalonat Kinase) und 25 µl Lösung 3 (100 mM Tris/HCl pH 7,5, 15 mM MgCl₂, 20 mM KCl, 0,6 mM ATP, 0,8 mM PEP, 0,6 mM NADH, 20 mM DTT, 0,02 % Tween 20) mit 200 mU Pyruvat Kinase, 400 mU Lactat Dehydrogenase.

In die verbleibenden Spalten wurde eine Prüfsubstanz in einer Konzentration von 2 µM in DMSO vorgelegt, wobei zum Verdünnen der Substanz H₂O verwendet wurde. Nach Zugabe von 20 µl Lösung 4 (100 mM Tris/HCl pH 7,5, 15 mM MgCl₂, 12,5 mM Glutathion, 0,25 % BSA, 0,1 µg Mevalonat Kinase) wurden zum Start der Reaktion 25 µl Lösung 3 (100 mM Tris/HCl pH 7,5, 15 mM MgCl₂, 20 mM KCl, 0,6 mM ATP, 0,8 mM PEP, 0,6 mM NADH, 20 mM DTT, 0,02 % Tween 20) mit 200 mU Pyruvat Kinase und 400 mU Lactat Dehydrogenase zugegeben. Es folgte eine Inkubation bei 25°C für 20 Minuten. Die anschließende Messung erfolgte durch Bestimmung der Absorption bei 340 nm in einem für MTP geeigneten SPECTRAFluor Plus von Tecan.

Beispiel 3

25 Nachweis der fungiziden Wirkung der identifizierten Inhibitoren der Mevalonat Kinase

In die Kavitäten von Mikrotiterplatten wurde eine methanolische Lösung des anhand eines erfindungsgemäßen Verfahrens identifizierten Wirkstoffs in der gewünschten Menge, versetzt mit einem Emulgator, pipettiert. Nachdem das Lösungsmittel abgedampft war, wurden je Kavität 200 µl Potatoe-Dextrose-Medium hinzugefügt. Das Medium wurde vorher mit geeigneten Konzentrationen von Sporen bzw. Mycelen des zu prüfenden Pilzes versetzt.

Die resultierende Konzentration des Emulgators betrug 300 ppm.

Die Platten wurden anschließend auf einem Schüttler bei einer Temperatur von 22°C inkubiert, bis in der unbehandelten Kontrolle ein ausreichendes Wachstum feststellbar war. Die Auswertung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 620 nm. Aus den Messdaten der verschiedenen Konzentrationen wird die Wirkstoffdosis, die zu einer 50 %igen Hemmung des Pilzwachstums gegenüber der unbehandelten Kontrolle führt (ED₅₀), berechnet.

5

Literatur

1. Chu, Xiusheng und Li, Ding, 2003, Cloning, expression, and purification of His-tagged rat mevalonate kinase. *Prot. Exp. Purific.* 27, 165-70.
2. Hinson et al., 1997, Post-translational regulation of mevalonate kinase by intermediates of the cholesterol and nonsterol isoprene biosynthetic pathways. *J. Lipid Res.* 38, 2216-2223.
3. Hofmann K. et al., 1999, The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Res.* 27, 215.
4. Karst und Lacroute, 1977, Ergosterol Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Gen.Genet.* 154, 269-277.
5. Lees et al., 1997, Biochemistry and molecular biology of sterol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry and Function of Sterols*, 85-99.
6. Mercer, 1984, The biosynthesis of ergosterol. *Pestic. Sci.* 15(2), 133-55.
7. Mumberg et al., 1995, Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* 156, 119-122.
8. Oulmouden und Karst, 1990, Isolation of the *ERG12* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding mevalonate kinase. *Gene*, 88, 253-257.
9. Oulmouden und Karst, 1991, Nucleotide sequence of the *ERG12* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding mevalonate kinase. *Curr. Genet.* 19, 9-14.
10. Schulte et al., 2000, Purification and characterization of mevalonate kinase from suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Arc. Biochem. Biophys.* 378(2), 287-298.
11. Tanaka et al., 1990, Purification and regulation of mevalonate kinase from rat liver *J. Biol. Chem.* 265(4), 2391-98.
12. Thompson et al., 1994, *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Identifizieren von Fungiziden, dadurch gekennzeichnet, dass man
 - (a) ein Polypeptid mit der enzymatischen Aktivität einer Mevalonat Kinase mit einer chemischen Verbindung oder einem Gemisch von chemischen Verbindungen unter Bedingungen, die die Interaktion der chemischen Verbindung mit dem Polypeptid erlauben, in Kontakt bringt,
 - (b) die Aktivität der Mevalonat Kinase bei Abwesenheit der chemischen Verbindung mit der Aktivität der Mevalonat Kinase bei Anwesenheit der chemischen Verbindung oder des Gemisches von chemischen Verbindungen vergleicht, und
 - (c) die chemische Verbindung, die die Mevalonat Kinase spezifisch inhibiert, auswählt.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man
 - (a) das bei der Reaktion der Mevalonat Kinase entstehende ADP mit Hilfe einer Pyruvatkinase zu ATP umsetzt,
 - (b) das dabei entstehende Pyruvat mit Hilfe einer Laktat Dehydrogenase unter NADH-Verbrauch zu Laktat umsetzt, und
 - (c) den Verbrauch des NADHs anhand einer Absorptionsänderung verfolgt.
3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Hemmung der enzymatischen Aktivität anhand einer geringeren Zunahme der ADP-Konzentration bestimmt.
4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass man in einem weiteren Schritt die fungizide Wirkung der identifizierten Verbindung testet, indem man sie mit einem Pilz in Kontakt bringt.
5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Mevalonat Kinase aus einem Pilz verwendet.
6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Mevalonat Kinase aus einem pflanzenpathogenen Pilz verwendet.

7. Verfahren zum Bekämpfen von pflanzenpathogenen Pilzen, dadurch gekennzeichnet, dass man einen Inhibitor einer pilzlichen Mevalonat Kinase auf den Pilz oder die vom Pilz befallene Pflanze einwirken lässt.
8. Verwendung von Inhibitoren eines Polypeptids mit der Aktivität einer Mevalonat Kinase, welche durch ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 identifiziert werden, als Fungizide.
9. Nukleinsäure, kodierend für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer Mevalonat Kinase, dadurch gekennzeichnet, dass sie für eine Mevalonat Kinase aus *U. maydis* kodiert.
10. Nukleinsäuren aus pflanzenpathogenen Pilzen, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Sequenz umfassen, die ausgewählt ist aus:
 - a) einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1,
 - b) Sequenzen, die für ein Polypeptid kodieren, welches die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2 umfasst und
 - c) Sequenzen, welche eine zumindest 90 %ige Identität mit den unter a) und b) definierten Sequenzen aufweisen und für das Sequenzmotiv [LIVM]-[PK]-x-[GSTA]-x(0,1)-G-[LM]-[GS]-S-S-[GSA]-[GSTAC] kodieren.
11. DNA-Konstrukt umfassend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 9 oder 10 und einen heterologen Promotor.
12. Vektor umfassend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 9 oder 10, oder ein DNA-Konstrukt gemäß Anspruch 11.
13. Vektor gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure funktionell mit regulatorischen Sequenzen verknüpft ist, die die Expression der Nukleinsäure in pro- oder eukaryotischen Zellen gewährleisten.
14. Wirtszelle enthaltend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 9 oder 10, ein DNA-Konstrukt gemäß Anspruch 11 oder einen Vektor gemäß Anspruch 12 oder 13.
15. Wirtszelle gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine prokaryotische oder eukaryotische Zelle handelt.

16. Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer Mevalonat Kinase, welches von einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 9 oder 10 kodiert wird.
17. Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer Mevalonat Kinase, welches eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2 umfasst.

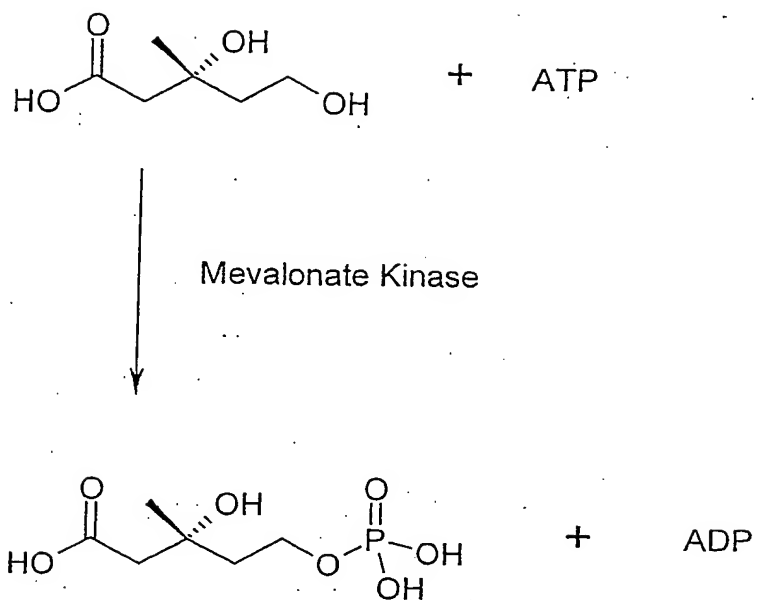


Abbildung 1

1 ----- S cerevisiae
 1 ----- S pombe
 1 ----- U maydis
 1 MAEQEHNGVNGFHSSESEQRNPVNGDASEAVNGNPSNGLRVITIEESASSA N crassa
 1 ----- M grisea partially

 1 -----MSLPFLT[SAPGKVT]IFGEHSAVYNK S cerevisiae
 1 -----MSKSLIVSSPGKTLIFGEHAVVYGA S pombe
 1 ---MNRARLETRGGEPRSAQDHPSPSSVVVSAPGKVILFGEHAVVHGI U maydis
 51 VNGGSPTNSMLTPIRQRMERKSSPMMPTFMVSAPGKVIVFGEHAVVHGM N crassa
 1 ----- M grisea partially

 26 FAVAAVSVALRTYLLISESS-APDTIETDFPDISFNMKWSINDFNATED S cerevisiae
 26 TATAAASVLSYCKLQTTN--NNEIVIVMSDGTERRWNLSLFWQHVT S pombe
 48 TAVAAASVLAQYANVSPRE--DGKISIDLPDLGVITWNIAADLPWSAVP U maydis
 101 AATAAASVLSYLLVNTLSKSKRTVTIKFPDIDFNHSWNIDELPWKIFQ N crassa
 1 -AVAAAIN-LRSYLLVTALSLSKRTITIRFPDIDLIETWNIDDLPWSTFS M grisea partially

 75 QVNSOKLAKAQOATDGLSQETIVSLDDPIAQLS--ES-----FHYHAFC S cerevisiae
 73 VENVQHPASSPNL-----DILQGLGELIKNEE--NG-----LIHSAMLC S pombe
 95 -KSIQGGGAVPDS---LDKTLIGAIEKVVGDTVNESE-----RSHAASIA U maydis
 150 QPGKKKYYYSLVLT--EIDQELVDVQPFADVSIDKPADIRKVHONSAGS N crassa
 49 QPSKKKYYIDLVT--SLDPDLMDAIQPHLEPVSSDAPDAQRKVHMSAAAA M grisea partially

 118 FLYMEVCIICPHAKN--IKFSIKSTLPIGAGLGSSASISVSIAIMAYLGG S cerevisiae
 110 TLYLETSISSPSQG--CTLTISSQVPIGAGLGSSATISVVVATSTLLAFG S pombe
 136 FLVLYMCIAQADARAQAFVIRSAIPIGAGLGSSPAISSCHAAITILYG U maydis
 198 FLYMELSLGSSQSFPGCQYTIIRSTIPIGAGLGSSATIAVCLSAAILLQLR N crassa
 97 FLYLEMSLGSHAFPGGIYTIIRSTIPIGAGLGSSASISACISAILLQIR M grisea partially

 166 LIGSNDLEKLSENDK---HIVNWAELIGEKCIIHGTPSGIDNAVATYGNAL S cerevisiae
 158 NIEPSSNSLQNNKA--LALTEAWSELGECIIHGTPSGIDNAVATNGGLI S pombe
 186 RIPAESELSAEHST---HINENWAEHSEKVIHGTPSGVDNTVAVHGGAI U maydis
 247 TSGEHPDQPPPEARLQIERINRWAEVYEMFIHGNPSGVDNTVSTQCKAV N crassa
 146 TSGEHPDQPPDEARVQVERINRWAEVAFEMCIHGNPSGVDNTVSTQCKAV M grisea partially

 213 LEEKDSHNGTINTNNFKFIDDEPAIPMILTYIRIPRSTKDLVARVRVLT S cerevisiae
 206 AERKATAH---QSAMKEFIKPKDTLSVMITDTKQPKSTKILVQGVFEIK- S pombe
 232 AETRAHPSNTLTANKMNIKGESSFRFLLVSCVGRECKLIAHVAAOK- U maydis
 297 VEQRTDYN---QPPSVRPLWDEPKLPLLLVDTRTAKSTAEHAKVATIK- N crassa
 196 VEQRLDYA---RPEVVTMPWDEPELPPLLVDTKQAKSTKYEVKVAKLR- M grisea partially

 263 EKFEVEMKPIIDAMGECALQGLEIMIKLSCKGTDDEAVETNNELYEQLL S cerevisiae
 252 ERLTVIDSIDAIDGISKSAVLALTSE-----SDKNSS---AKKLG S pombe
 281 ESEETRVNAAIARIQTIADSAQLVLTGN-----SGLSRSEQ---VAQLR U maydis
 343 KKHEQLVGTILTAIDQVTQSSAQLIEEQ---GFNTEDEES---LSKVG N crassa
 242 ETHEKIVNSIIDSMDKLTQAATDVLTDE----DFDNEDVES---LQKVG M grisea partially

 313 ELIRINEGLLVSIGVSHPGLELIKNISSDLRIG--STKLTGAGGGGGSIT S cerevisiae
 291 EFIVLNQKLIIECLGVSHYSIDRV--LOATKSIG--WTKLTGAGGGGGSIT S pombe
 322 ELIKQNHSELVGLVSHASLELIKNTESFAPDQATKLTGAGGGGCAVI U maydis
 385 EMMTINHGLLVSLGVSHPRLEVRVREIVDHEGIG--WTKLTGAGGGGGSIT N crassa
 284 ELMGMNHGLLVSLGVSHPRLEVRVREIVDHEGIG--WTKLTGAGGGGGSIT M grisea partially

361	LIRRDITQEQIDSFKKKIQDDFSYETFETDLGGTGCCLLSAKLNKDLKI	S cerevisiae
337	LITPECKEDEFKLCESILAHK-NSIYDVQLGGPGVSVVTDSDS-----	S pombe
372	LIPDDFEEFKVKELMSELENAG-FKCYETRVGGDQFGVKLLQDEQE----	U maydis
433	LIRPGVPREKLDKLEQRLEEG-YSKFETTLGSDQVGVLWPAVLKNGMDE	N crassa
332	LMRPDVPREKLERLKERUDHE	M grisea partially
411	KS-----LVFQLFENKTTTKQQIDDLLLPGNTNLPWTS	S cerevisiae
380	-----FFPQYESDFDFKKLNLLSKFNKYYI	S pombe
417	--E-----AEAKLRFKEANVSNELAVWADELAGWVFA.	U maydis
482	DEEGGMEIDLEKFLSADSNEALEKLVGVHGDREGWKFWRVENRD	N crassa
352		M grisea partially

Abbildung 2

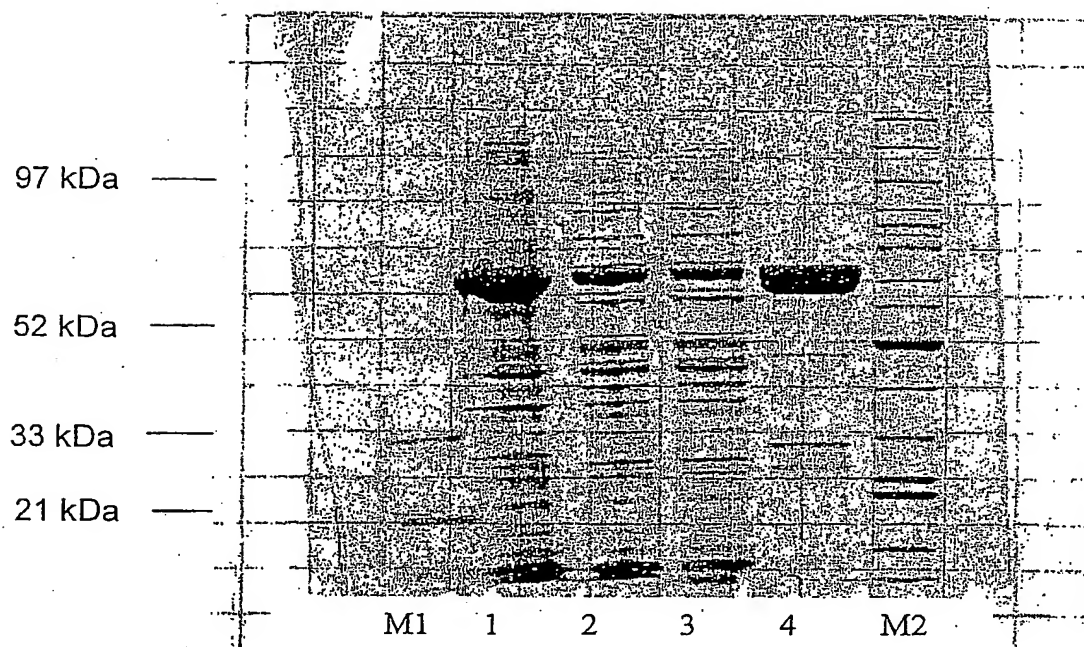


Abbildung 3

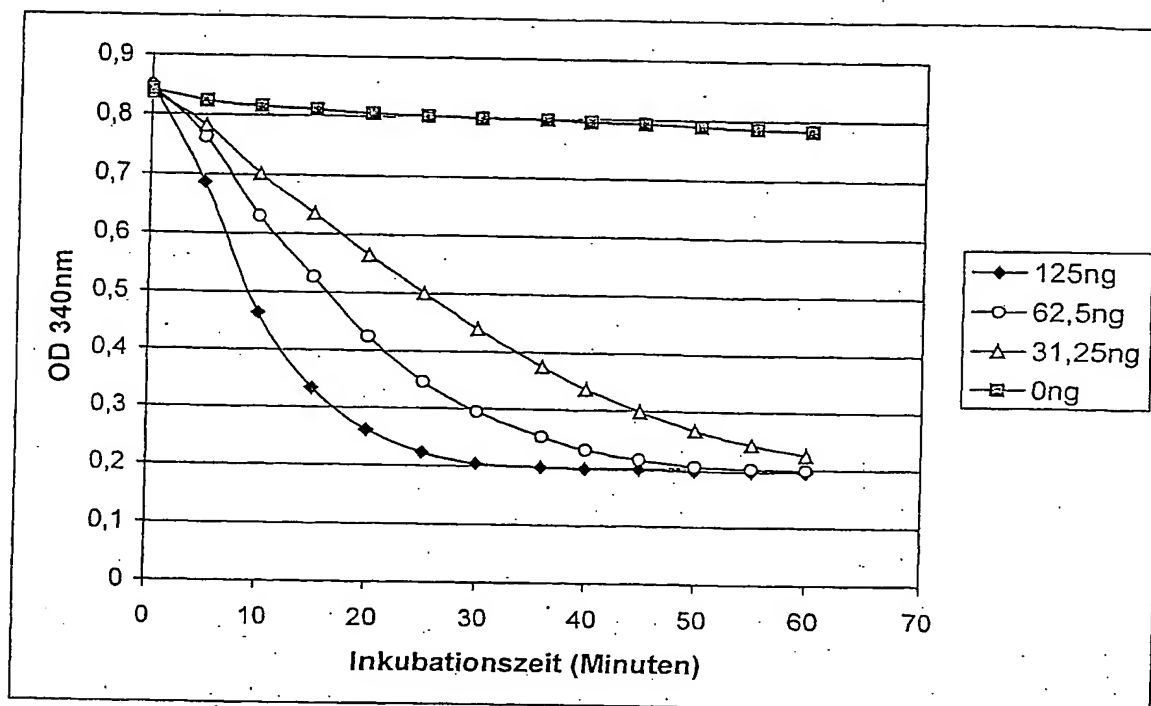


Abbildung 4

SEQUENCE LISTING

<110> Bayer CropScience AG

<120> Verfahren zum Identifizieren von fungizid wirksamen Verbindungen basierend auf Mevalonat Kinasen aus Pilzen

<130> BCS 03-3035

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1341

<212> DNA

<213> Ustilago maydis

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1341)

<223>

<400> 1

atg aac cgt gca agg ctc gag acc cgc ggc ggt gaa ggg gaa cct cgc
48Met Asn Arg Ala Arg Leu Glu Thr Arg Gly Gly Glu Gly Glu Pro Arg
1 5 10 15tcg gct cag gat cac ccg ccg ccg tcg tcg gtg gtt gtc agt gcg cct
96Ser Ala Gln Asp His Pro Pro Pro Ser Ser Val Val Val Ser Ala Pro
20 25 30ggc aag gtg atc ctt ttc ggt gag cac gca gtg gtg cat ggt att act
144Gly Lys Val Ile Leu Phe Gly Glu His Ala Val Val His Gly Ile Thr
35 40 45gct gtc gcc gcc tcg gtg gcg ctg cga tgc tac gct aac gta tcg cca
192Ala Val Ala Ala Ser Val Ala Leu Arg Cys Tyr Ala Asn Val Ser Pro
50 55 60cga gag gat ggc aag att tcg ctc gat ttg cct gat ctc ggc gtg atc
240Arg Glu Asp Gly Lys Ile Ser Leu Asp Leu Pro Asp Leu Gly Val Ile
65 70 75 80cac act tgg aac atc gcc gat ctt cct tgg tct gct gtg cct aaa tcc
288His Thr Trp Asn Ile Ala Asp Leu Pro Trp Ser Ala Val Pro Lys Ser
85 90 95att caa ggt ggt ggc gcc gta cct gac tcg ctc gac aag acg ctt att
336

Ile Gln Gly Gly Gly Ala Val Pro Asp Ser Leu Asp Lys Thr Leu Ile

100 105 110
 ggc gcc atc gaa aag gtg gtg ggc gac acg gtc aac gag agc gaa aga
 384
 Gly Ala Ile Glu Lys Val Val Gly Asp Thr Val Asn Glu Ser Glu Arg
 115 120 125
 agc cat gct gct tcg atc gcc ttt ctg gtg ctt tac atg tgc atc gcc
 432
 Ser His Ala Ala Ser Ile Ala Phe Leu Val Leu Tyr Met Cys Ile Ala
 130 135 140
 ggt cag gct gat gcg cgc gct cag gca ttt gtg ctg cgt tcg gct ctg
 480
 Gly Gln Ala Asp Ala Arg Ala Gln Ala Phe Val Leu Arg Ser Ala Leu
 145 150 155 160
 ccc atc ggt gca gga ctc ggc tca agc gcc gcg ctc agc tcg tgc ctc
 528
 Pro Ile Gly Ala Gly Leu Gly Ser Ser Ala Ala Leu Ser Ser Cys Leu
 165 170 175
 gct gcg gcg ctc acc atc ctc tat ggt cgc att ccc gct ccg ggc agc
 576
 Ala Ala Ala Leu Thr Ile Leu Tyr Gly Arg Ile Pro Ala Pro Gly Ser
 180 185 190
 gaa ctg tca gct gag cac tcg aca cac atc aac gaa tgg gcc ttt ttg
 624
 Glu Leu Ser Ala Glu His Ser Thr His Ile Asn Glu Trp Ala Phe Leu
 195 200 205
 tct gaa aag gta att cac ggc acc ccc tcg ggt gtt gac aac acg gtg
 672
 Ser Glu Lys Val Ile His Gly Thr Pro Ser Gly Val Asp Asn Thr Val
 210 215 220
 gct gtt cat ggc gga gcg atc gct ttc act cgt gct cac cca agc aac
 720
 Ala Val His Gly Gly Ala Ile Ala Phe Thr Arg Ala His Pro Ser Asn
 225 230 235 240
 acg ctc aca gcc aac aag atg aac aag ctc aaa ggc ttc tct tcg ttc
 768
 Thr Leu Thr Ala Asn Lys Met Asn Lys Leu Lys Gly Phe Ser Ser Phe
 245 250 255
 cgt ttc ctc ctc gtc gac agc tgc gtc ggc cgc gag ggc aag aag ctg
 816
 Arg Phe Leu Leu Val Asp Ser Cys Val Gly Arg Glu Gly Lys Lys Leu
 260 265 270
 atc gct cac gtt gca gct cag aag gaa tcc gag ccg act cgt gtc aat
 864
 Ile Ala His Val Ala Ala Gln Lys Glu Ser Glu Pro Thr Arg Val Asn
 275 280 285
 gcg gct ctc gct cga atc cag acg atc gcc gat tcg gcc cag ctc gtg
 912
 Ala Ala Leu Ala Arg Ile Gln Thr Ile Ala Asp Ser Ala Gln Leu Val
 290 295 300
 ctc act ggc aac tcg ggt ctc tct cgc tcc gag caa gtt gca cag ctt
 960
 Leu Thr Gly Asn Ser Gly Leu Ser Arg Ser Glu Gln Val Ala Gln Leu

305 310 315 320
 cgc gaa ctg atc aag cag aac cat agc gaa ctt gtt ggg ctc gag gta
 1008
 Arg Glu Leu Ile Lys Gln Asn His Ser Glu Leu Val Gly Leu Glu Val
 325 330 335
 tcg cac gct tcg ctg gag ttg atc aag aac aag acc gag tcg ttt gca
 1056
 Ser His Ala Ser Leu Glu Leu Ile Lys Asn Lys Thr Glu Ser Phe Ala
 340 345 350
 ccc gat cag ctg gct act aag ctc aca ggt gcc gga gga gga gga tgt
 1104
 Pro Asp Gln Leu Ala Thr Lys Leu Thr Gly Ala Gly Gly Gly Cys
 355 360 365
 gca gtt aca ctg ctg ccg gac gac ttt gag gag gag aag gtg aag gag
 1152
 Ala Val Thr Leu Leu Pro Asp Asp Phe Glu Glu Glu Lys Val Lys Glu
 370 375 380
 ctg atg agc gag ctg gag aat gct ggc ttt aag tgc tac gag acc aga
 1200
 Leu Met Ser Glu Leu Glu Asn Ala Gly Phe Lys Cys Tyr Glu Thr Arg
 385 390 395 400
 gtg gga ggt gac ggc ttc ggc gtc aag ctt ctg cag gac gaa cag gag
 1248
 Val Gly Gly Asp Gly Phe Gly Val Lys Leu Leu Gln Asp Glu Gln Glu
 405 410 415
 gag gcc gag gcc aag ctg cga ttc aag gaa gcc aac gtg agc aac gag
 1296
 Glu Ala Glu Ala Lys Leu Arg Phe Lys Glu Ala Asn Val Ser Asn Glu
 420 425 430
 ctg gct gtg tgg gct gat gag ctt gct ggt tgg gta ttt gcc tga
 1341
 Leu Ala Val Trp Ala Asp Glu Leu Ala Gly Trp Val Phe Ala
 435 440 445

<210> 2

<211> 446

<212> PRT

<213> Ustilago maydis

<400> 2

Met Asn Arg Ala Arg Leu Glu Thr Arg Gly Gly Glu Gly Glu Pro Arg
 1 5 10 15

Ser Ala Gln Asp His Pro Pro Pro Ser Ser Val Val Val Ser Ala Pro
 20 25 30

Gly Lys Val Ile Leu Phe Gly Glu His Ala Val Val His Gly Ile Thr
 35 40 45

Ala Val Ala Ala Ser Val Ala Leu Arg Cys Tyr Ala Asn Val Ser Pro
 50 55 60

Arg Glu Asp Gly Lys Ile Ser Leu Asp Leu Pro Asp Leu Gly Val Ile
 65 70 75 80

His Thr Trp Asn Ile Ala Asp Leu Pro Trp Ser Ala Val Pro Lys Ser
 85 90 95

Ile Gln Gly Gly Gly Ala Val Pro Asp Ser Leu Asp Lys Thr Leu Ile
 100 105 110

Gly Ala Ile Glu Lys Val Val Gly Asp Thr Val Asn Glu Ser Glu Arg
 115 120 125

Ser His Ala Ala Ser Ile Ala Phe Leu Val Leu Tyr Met Cys Ile Ala
 130 135 140

Gly Gln Ala Asp Ala Arg Ala Gln Ala Phe Val Leu Arg Ser Ala Leu
 145 150 155 160

Pro Ile Gly Ala Gly Leu Gly Ser Ser Ala Ala Leu Ser Ser Cys Leu
 165 170 175

Ala Ala Ala Leu Thr Ile Leu Tyr Gly Arg Ile Pro Ala Pro Gly Ser
 180 185 190

Glu Leu Ser Ala Glu His Ser Thr His Ile Asn Glu Trp Ala Phe Leu
 195 200 205

Ser Glu Lys Val Ile His Gly Thr Pro Ser Gly Val Asp Asn Thr Val
 210 215 220

Ala Val His Gly Gly Ala Ile Ala Phe Thr Arg Ala His Pro Ser Asn
 225 230 235 240

Thr Leu Thr Ala Asn Lys Met Asn Lys Leu Lys Gly Phe Ser Ser Phe
 245 250 255

Arg Phe Leu Leu Val Asp Ser Cys Val Gly Arg Glu Gly Lys Lys Leu
 260 265 270

Ile Ala His Val Ala Ala Gln Lys Glu Ser Glu Pro Thr Arg Val Asn
 275 280 285

Ala Ala Leu Ala Arg Ile Gln Thr Ile Ala Asp Ser Ala Gln Leu Val
 290 295 300

Leu Thr Gly Asn Ser Gly Leu Ser Arg Ser Glu Gln Val Ala Gln Leu
305 310 315 320

Arg Glu Leu Ile Lys Gln Asn His Ser Glu Leu Val Gly Leu Glu Val
325 330 335

Ser His Ala Ser Leu Glu Leu Ile Lys Asn Lys Thr Glu Ser Phe Ala
340 345 350

Pro Asp Gln Leu Ala Thr Lys Leu Thr Gly Ala Gly Gly Gly Gly Cys
355 360 365

Ala Val Thr Leu Leu Pro Asp Asp Phe Glu Glu Glu Lys Val Lys Glu
370 375 380

Leu Met Ser Glu Leu Glu Asn Ala Gly Phe Lys Cys Tyr Glu Thr Arg
385 390 395 400

Val Gly Gly Asp Gly Phe Gly Val Lys Leu Leu Gln Asp Glu Gln Glu
405 410 415

Glu Ala Glu Ala Lys Leu Arg Phe Lys Glu Ala Asn Val Ser Asn Glu
420 425 430

Leu Ala Val Trp Ala Asp Glu Leu Ala Gly Trp Val Phe Ala
435 440 445

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/006766

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/54 C12N9/12 C12Q1/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 505 941 A (SQUIBB & SONS INC) 30 September 1992 (1992-09-30) page 2, line 1 - line 5 page 8, line 37 - line 38	8
A	US 2002/119546 A1 (FALCO SAVERIO CARL ET AL) 29 August 2002 (2002-08-29) claim 21	1-6
A	EP 0 955 363 A (HOFFMANN LA ROCHE) 10 November 1999 (1999-11-10) example 10	9-17
A	WO 03/012129 A (ARROW THERAPEUTICS LTD ; CHARLES IAN GEORGE (GB)) 13 February 2003 (2003-02-13)	
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 October 2004

Date of mailing of the international search report

18/11/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kania, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/006766

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	<p>WO 2004/070038 A (BASF AG ; FREUND ANNETTE (DE); LACOUR THIERRY (DE); RETHER JAN (DE)) 19 August 2004 (2004-08-19) the whole document</p>	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2004/006766**Box I** Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2004/006766

Continuation of Box III

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims 1-8

Method for identifying fungicides, using a mevalonate kinase, and use of the identified mevalonate kinase activity inhibitors as fungicides, in particular for the control of plant pathogenic fungi.

2. Claims 9-17

Nucleic acid and polypeptide sequences which code for a mevalonate kinase from *Ustilago maydis* of SEQ ID No. 1 or 2, and related embodiments.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/006766

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0505941	A	30-09-1992	US 5165931 A	24-11-1992
			CA 2061476 A1	29-09-1992
			EP 0505941 A2	30-09-1992
			JP 5078380 A	30-03-1993
US 2002119546	A1	29-08-2002	NONE	
EP 0955363	A	10-11-1999	EP 0955363 A2	10-11-1999
			AU 762939 B2	10-07-2003
			AU 2696299 A	18-11-1999
			BR 9901403 A	17-10-2000
			CA 2270711 A1	06-11-1999
			CN 1234445 A	10-11-1999
			ID 23300 A	05-04-2000
			JP 2000050884 A	22-02-2000
			NO 992165 A	08-11-1999
			US 6284506 B1	04-09-2001
			US 2003190734 A1	09-10-2003
			US 2003054523 A1	20-03-2003
WO 03012129	A	13-02-2003	WO 03012129 A2	13-02-2003
WO 2004070038	A	19-08-2004	WO 2004070038 A1	19-08-2004

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/006766

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/54 C12N9/12 C12Q1/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 505 941 A (SQUIBB & SONS INC) 30. September 1992 (1992-09-30) Seite 2, Zeile 1 - Zeile 5 Seite 8, Zeile 37 - Zeile 38 -----	8
A	US 2002/119546 A1 (FALCO SAVERIO CARL ET AL) 29. August 2002 (2002-08-29) Anspruch 21 -----	1-6
A	EP 0 955 363 A (HOFFMANN LA ROCHE) 10. November 1999 (1999-11-10) Beispiel 10 -----	9-17
A	WO 03/012129 A (ARROW THERAPEUTICS LTD ; CHARLES IAN GEORGE (GB)) 13. Februar 2003 (2003-02-13) -----	
	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll, oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. Oktober 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

18.11.04

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Kania, T

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/006766

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

"Kategorie"	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
E	<p>WO 2004/070038 A (BASF AG ; FREUND ANNETTE (DE); LACOUR THIERRY (DE); RETHER JAN (DE)) 19. August 2004 (2004-08-19) das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-8

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☒ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-8

Verfahren zur Identifizierung von Fungiziden unter Verwendung einer Mevalonat Kinase, sowie Verwendung der identifizierten Inhibitoren der Mevalonat Kinase-Aktivität als Fungizide, insbesondere zur Bekämpfung pflanzenpathogener Pilze.

2. Ansprüche: 9-17

Nukleinsäure- und Polypeptidsequenzen, die für eine Mevalonat Kinase aus *Ustilago maydis* kodieren gemäß SEQ ID NO:1,2, sowie diesbezügliche Ausführungsformen.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/006766

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0505941 A	30-09-1992	US 5165931 A CA 2061476 A1 EP 0505941 A2 JP 5078380 A	24-11-1992 29-09-1992 30-09-1992 30-03-1993
US 2002119546 A1	29-08-2002	KEINE	
EP 0955363 A	10-11-1999	EP 0955363 A2 AU 762939 B2 AU 2696299 A BR 9901403 A CA 2270711 A1 CN 1234445 A ID 23300 A JP 2000050884 A NO 992165 A US 6284506 B1 US 2003190734 A1 US 2003054523 A1	10-11-1999 10-07-2003 18-11-1999 17-10-2000 06-11-1999 10-11-1999 05-04-2000 22-02-2000 08-11-1999 04-09-2001 09-10-2003 20-03-2003
WO 03012129 A	13-02-2003	WO 03012129 A2	13-02-2003
WO 2004070038 A	19-08-2004	WO 2004070038 A1	19-08-2004